

Postverlagsort Berlin

UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY

JUN 24 '64

ARCHIV FÜR MIKROBIOLOGIE

BEGRÜNDET VON

J. BEHRENS F. BOAS A. RIPPEL

HERAUSGEGEBEN VON

C. B. VAN NIEL
PACIFIC GROVE

R. NILSSON
UPPSALA

E. G. PRINGSHEIM
GÖTTINGEN vorm. CAMBRIDGE

W. H. SCHOPFER
BERN

H. TAMIYA
TOKIO

UND DEN SCHRIFTFLEITERN

A. RIPPEL-BALDES
GÖTTINGEN

R. HARDER
GÖTTINGEN

25. BAND · 1. HEFT

MIT 57 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 18. JULI 1956)



SPRINGER-VERLAG

BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

1956

Per
QR 1
Ar 25

Arch.
Mikrobiol.

Archiv für Mikrobiologie

Zeitschrift für die Erforschung der pflanzlichen Mikroorganismen. Begründet 1930
von J. Behrens, F. Boas, A. Rippel. Berlin, Springer.

Das „Archiv für Mikrobiologie“ steht Originalarbeiten und Sammelreferaten aus dem Gesamtgebiet der pflanzlichen Mikroorganismen offen. Arbeiten, die nur praktischen Zwecken dienen, scheiden aus, während im übrigen alle wissenschaftlichen Fragen aus „reinen“ und „angewandten“ Gebieten berücksichtigt werden.

Das „Archiv“ erscheint nach Maßgabe des eingehenden Materials. Der Preis des Bandes beträgt DM 96.—.

Der Autor erhält einen Unkostensatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 30.— für eine Arbeit. Sammelreferate werden mit DM 40.— für den Druckbogen honoriert.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophotos u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihren Arbeiten 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Manuskripte erbeten an:

Prof. Dr. C. B. van Niel, California/USA, Pacific Grove, Stanford University, Hopkins Marine Station,

Prof. Dr. R. Nilsson, Uppsala 7/Schweden, Kungl. Lantbrukshögskolan, Mikrobiologiska Institutionen,

Prof. Dr. E. G. Pringsheim, Göttingen, Untere Karspüle, Pflanzenphysiologisches Institut,

Prof. Dr. W. H. Schopfer, Bern/Schweiz, Botanisches Institut der Universität,

Prof. Dr. H. Tamiya, Tokio/Japan, 41, Mejiro-Machi 4th St., The Tokugawa Institute for Biological Research,

oder an die

Schriftleitung:

Prof. Dr. A. Rippel-Baldes, Göttingen, Institut für Mikrobiologie, Goßlerstr. 16

Prof. Dr. R. Harder, Göttingen, Pflanzenphysiolog. Institut, Nikolausberger Weg 18

Springer-Verlag

Berlin · Göttingen · Heidelberg

25. Band

Inhaltsverzeichnis

1. Heft

Seite

NILSSON, G., P. E. NILSSON and A. ABRAHAMSSON, Origin of Spores of Anaerobic Micro-organisms in Milk. The Influence of Feeding-practice and Hygienic Arrangements. With 3 figures in the text	1
CLAUS, D., Über Hemmstoffwirkung und Resistenzbildung bei Bakterien. Mit 16 Textabbildungen	10
SCHELHOORN, M. v., Untersuchungen über das Absterben von Hefen und anderen Mikroorganismen in Substraten von hohem NaCl- bzw. Zuckergehalt. Mit 2 Textabbildungen	39
TAKAMIYA, A., and K. TUBAKI, A New Form of Streptomyces Capable of Growing Autotrophically. With 9 figures in the text	58
HUND, A., und O. KANDLER, Zur Ernährungsweise und Physiologie von Caulobacter. Mit 15 Textabbildungen	65
MARTIN, H. H., und G. PAMPUS, Untersuchung über die Bildung des Actinomycins X. Über die Beeinflussung des Komponentenverhältnisses beim Actinomycin X durch Variation der mikrobiologischen Kulturbedingungen. Mit 12 Textabbildungen	90

(From the Institute of Microbiology at the Royal Agricultural College of Sweden,
Uppsala 7, Sweden)

Silage studies. V.

Origin of Spores of Anaerobic Microorganisms in Milk*

The Influence of Feeding-practice and Hygienic Arrangements

By

GERDA NILSSON, PER ERIC NILSSON and ANDERS ABRAHAMSSON

With 3 figures in the text

(Eingegangen am 26. März 1956)

Research on silage suffers seriously from the lack of definite standards of silage quality. There has been much discussion on which characteristics are to be considered as basic for the estimation of quality, and until such characteristics are established no reliable standards can be expressed.

A basic qualification of a cattle fodder is its effect on the animal product. In the present connexion this is essentially the same as its effect on the milk quality, the quantitative aspect of production not being taken into consideration.

As far as only such silage qualities that are suitable for fodder are concerned, investigations made by various workers indicate the ill effects of silage on milk quality to be limited to infection by anaerobic spores and disturbances due to the subsequent development of the anaerobes.

Thus THOMÉ and SWARTLING (1952) investigated the influence of silage-feeding on milk-quality, and found the only deleterious effect to be a disturbance in cheese-making due to infection by spores of butyric acid bacteria. They claim that in cheese-making the spore content of the milk must be kept rigorously under control, and that spore-free milk can be produced only by using silage of very high quality or possibly by improving hygienic standards in milk-production. The butyric acid bacteria of silage have been investigated also by VAN BEYNUM and PETTE (1934), who found the main part of this flora able to ferment lactate. In a recent investigation FRENS (1954) found spores of butyric acid bacteria frequently occurring in silage of different qualities. When feeding with silage of high spore-content it was very difficult to prevent infection of the milk.

ALLEN and HARRISON (1937) found in their studies of this group of bacteria in silage a predominant fraction of *Clostridium sporogenes*. This strain is less anaerobic than *Cl. butyricum*.

An important hygienic factor in milk production is the degree of contamination by faeces, the spore-content of which can greatly affect the milk quality. The

* These studies are still in progress. We are indebted to the Swedish Foundation: "Fonden för främjande av forsknings- och försöksverksamheten på jordbrukets område" for generous financial support. We also gratefully acknowledge the encouraging interest and support of Professor R. NILSSON.

content of spores of butyric acid bacteria in faeces was investigated by LIND (1951), who found in faeces from cows fed with a good silage about 1,000 spores per gram, and in faeces from cows fed with a bad silage 100,000—1,000,000 spores per gram.

On the other hand an investigation made by PEDERSEN (1940/41) on the influence of silage feeding on the quality of milk products shows no harmful effect of silage. Milk from cows fed with silage gave better butter than milk from cows not fed with silage. He did not find any differences in number of spores of butyric acid bacteria in milk produced by the two different feeding systems, but found a higher coli infection in the silage series.

VIRTANEN (1937) has investigated the content of spores of butyric acid bacteria in silage preserved by various methods, and has found that the spores are not destroyed in AIV-silage.

A fairly high content of anaerobic spores does not necessarily mean that the silage is unsuitable for fodder. Therefore if the transfer of spores from silage to milk could only be eliminated, a certain number of spores could be tolerated in silage. Several important points now arise. What number of spores can be tolerated? Would it be possible, by improving the hygiene and technique of milk-production, to use a silage of higher spore-content? Investment in such improvements might be more economical than employing a method of silage-making which would strictly eliminate the development of even small numbers of anaerobic organisms.

In the present paper will be reported some findings regarding the origin of anaerobic spores in milk, and some observations on how hygienic arrangements and feeding practice influence the spore-content of milk.

Materials and methods

Twenty-six farms, distributed in five counties in mid-Sweden, were chosen for sampling. Four farms in each county fed with silage. The hygienic standards were good at two of them and less satisfactory at the other two¹. Samples were in the first place taken from silage, hay, faeces, air, and milk. Samples were also taken from straw and drinking-water, but these were considered of secondary interest. The milk-vessels were washed with 500 ml of a 0.02% solution of a surface-active agent (Tween 20), and samples were taken from the washing-water. In preliminary experiments the concentration of Tween 20 used was found to develop no anti-germinative effect on the microflora.

The local conditions of milk production were estimated.

All sampling was done at the afternoon milking.

The collection of spores from air was made in the following manner. A washing-flask was filled with a certain volume of water (20 ml). To this volume was added Tween 20 to lower the surface tension, which gave more efficient collection of spores from the air which was bubbled through in small bubbles. Ten litres of air were bubbled through at a rate of one litre per three minutes, the air being drawn through the water by connecting a ten-litre flask to the washing flask and allowing the water run out at the desired rate.

The number of anaerobic spores belonging to the *Clostridium* group were in most cases estimated according to the method of RUSCHMANN and HARDER (1931).

¹ Suitable farms were found thanks to valuable collaborations from the county advisory officers.

Oxygen was eliminated from the tubes by pouring a cysteine agar on top of the media. Milk samples with low spore-content were analysed according to a modification of the WEINZIRL test proposed by VAN BEYNUM and PETTE (1934).

Spores of the lactate-fermenting fraction of the anaerobic microbes were counted on a medium as described by ROSENBERGER (1951), by inoculation with samples showing a positive reaction in the general test.

The number of spores was calculated from the results of analysis according to the method of MCCRADY (1946).

The following were estimated on the silage samples: p_H , dry matter, total N, ammonia-N, soluble carbohydrates, lactic acid, acetic acid, propionic acid, butyric acid, and some higher volatile acids.

The standard of hygiene was estimated by examining the suitability of various technical arrangements and the organization of labour. As this estimate was to be of fundamental importance in the discussion of means of preventing transfer of spores to the milk, it was checked in as many ways as possible. Milk-bottle samples were tested, and methylene-blue checks were made at the dairies. Diagram I shows the variations of these tests within the various hygienic groups made up by the farms (on the basis of the estimate). Hay-farms make a separate group, the silage farms comprising groups A—D of which A has the highest hygienic standard and D the lowest.

The diagram shows good correlation between the classification into hygienic groups and the control tests, indicating that it forms a reliable basis for further discussion.

Table I gives the data from the bacteriological analyses, showing total spores of anaerobes and spores of lactate fermenters, as well as the hygienic assessment of individual farms.

The data from the chemical analyses are collected in table 2. In this table is also included an attempt at classifying the quality of the silages, using the method of FLIEG (1938), which to judge from other branches of our investigations on silage seems to give certain useful information.

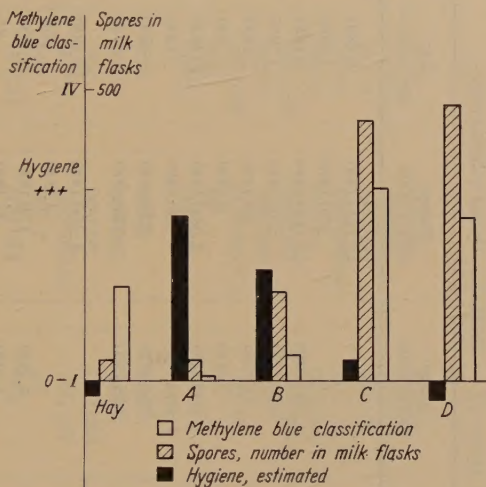


Fig. 1. Total number of spores in milk flasks and methylene blue classification in hygienic groups on basis of estimation

Table 1. *Number of spores* (T = total, L = lactate fermenters)

Farm		Air spores/litre	Washing spores/milk can	Milk spores/litre	Silage spores/gram	Faeces spores/gram	Hay spores/gram	Straw spores/gram	Hygienic standard: visual insp.
H 1	T	1.8	150	0.1	—	42,000,000	6,000	3,000	±
	L	—	—	0.1	—	150,000	1,860	300	+
1	T	1.8	7,500	9.3	4,200,000	42,000,000	6,000		+
	L	0.8	150	4.2	930,000	210,000	1,500		+
2	T	—	300	0.1	42,000	93,000	3,000		+
	L	—	—	0.1	1,500	6,000	200		+
3	T	1.8	10,500	2.1	4,200,000	2,300,000	20,000		+
	L	1.8	450	2.1	1,500,000	930,000	2,000		+
4	T	1.6	1,750	0.8	210,000	630,000	500		+
	L	—	500	0.8	115,000	230,000	150		+
H 2	T	—	3,750	23	—	4,200,000	18,600	4,600	+
	L	—	—	0.1	—	4,200	250	460	+
5	T	—	1,150	4.2	4,200	150,000	8,400	850	+
	L	—	—	0.1	1,500	23,000	85	150	+
6	T	—	—	2.3	42,000	2,100,000	2,000		+
	L	—	—	—	10,000	150,000	1,500		—
7	T	2	2,100	100	75,000	11,500,000	18,600		—
	L	—	300	0.4	3,800	150,000	1,000		—
8	T	0.8	4,650	100	300,000	15,000,000	460,000	20,000	—
	L	—	1,250	9.3	115,000	93,000	2,300	850	—
H 3	T	0.8	150	—	—	42,000	85	450	—
	L	—	—	—	—	420	45	45	+
9	T	0.8	150	9.3	100,000	2,400,000	3,000		+
	L	—	150	3	10,000	75,000	100		+
10	T	—	1,250	0.3	7,500	230,000,000	185		+
	L	—	150	0.1	1,500	9,300	30		+

Table 1. (Continued)

H 4	T	500	—	—	—	23,000,000	460	—
	L	150	—	—	—	1,500	180	—
11	T	500	0.1	—	930	420,000	460,000	+
	L	—	—	—	23	4,200	65	+
12	T	650	1	1	4,200	300,000	85	—
	L	250	1	1	1,500	7,500	30	—
H 5	T	300	—	—	—	23,000	840	±
	L	—	—	—	—	420	840	±
13	T	—	0.3	—	420	36,000	4,600	+
	L	—	0.2	—	230	2,100	190	+
14	T	—	7.5	—	230	420,000	12,000	+
	L	—	2.3	—	42	4,200	460	+
15	T	450	1000	—	420,000	23,000,000	4,500	—
	L	—	10	—	420,000	93,000	600	—
16	T	500	4.2	—	4,200	230,000	4,500	—
	L	—	2.3	—	4,200	9,300	850	—
H 6	T	1,150	0.2	—	—	93,000	3,000	+
	L	—	0.1	—	—	93	850	+
17	T	1,150	1.5	—	10,000	2,300,000	460,000	+
	L	1,150	1	—	150	930,000	1,500	+
18	T	1,150	42	—	7,500,000	210,000	460,000	+
	L	1,150	9.3	—	4,200,000	42,000	2,000	—
19	T	—	93	—	1,500,000	23,000,000	6,000	—
	L	—	15	—	42,000	1,500,000	3,000	—
20	T	200	12	—	15,000	300,000	46,000	±
	L	—	6.4	—	15,000	28,000	850	±

H 1—H 6 = Hay farms; 1—20 = Silage farms; + + + = very high — — — = very low

Table 2. *Chemical analysis of silage-samples from the various farms*

Farm	Dry matter %	Total N %	NH ₄ -N %	Sugar %	Lactic acid %	Acetic acid %	Butyr. acid %	Prop. acid %	High. vol. acids %	pH	FLIEG units
1	16.6	0.411	0.050	0.04	0.9	0.70	0.43	0.08	0.15	4.4	32
2	23.5	0.740	0.048	0.13	2.8	0.75	0.01	0.03	0.01	4.2	49
3	19.5	0.470	0.048	0.04	0.9	1.13	0.19	0.13	0.03	4.6	30
4	17.9	0.699	0.284	0.06	0.7	1.23	1.37	0.48	0.74	5.5	16
5	20.1	0.439	0.058	0.04	0.9	1.20	0.04	0.04	0.02	4.4	33
6	22.3	0.641	0.028	0.42	2.3	0.39	0.04	0.02	0.03	4.0	49
7	27.5	0.635	0.071	1.30	2.0	0.64	0.39	0.06	0.05	4.3	44
8	20.5	0.510	0.054	0.04	2.1	0.88	0.09	0.05	0.01	4.2	48
9	26.3	0.665	0.033	0.11	3.2	0.69	0.02	0.03	0.00	4.1	49
10	29.0	0.723	0.059	0.44	4.1	0.71	0.08	0.01	0.01	4.0	49
11	27.6	0.798	0.036	0.05	2.5	0.74	0.01	0.03	0.01	3.9	49
12	19.9	0.645	0.048	0.04	2.5	0.69	0.02	0.04	0.01	4.0	49
13	21.7	0.676	0.055	0.05	2.6	1.01	0.0	0.09	0.01	4.3	49
14	25.9	0.636	0.045	0.30	2.5	0.60	0.01	0.01	0.0	4.2	49
15	20.1	0.559	0.147	0.04	0.5	1.09	1.11	0.30	0.48	5.0	16
16	23.1	0.477	0.058	0.34	2.7	0.87	0.04	0.03	0.02	4.6	47
17	28.8	0.784	0.084	0.21	3.0	0.79	0.03	0.03	0.01	4.2	49
18	19.0	0.626	0.183	0.05	0.6	1.36	0.80	0.24	0.81	5.0	17
19	24.9	0.653	0.090	0.04	1.9	1.13	0.28	0.08	0.12	4.7	39
20	20.2	0.617	0.048	0.13	2.6	0.53	0.10	0.02	0.02	4.1	48

The distribution of the silages within different quality-groups on the basis of FLIEG-units is shown in table 3.

Table 3. *The distribution of the silage samples within different quality-groups*

Number of silage samples	PH	Means Butyric-acid	Lactate fermenters	FLIEG-units Individual	Means
9	4.1	0.02	2.770	49	49
4	4.4	0.16	34.500	44, 47, 48, 48	46.75
4	4.5	0.24	618.400	30, 32, 33, 39	33.5
3	5.2	1.09	1.578.000	16, 16, 17	16.3

This table also demonstrates the close connexion between content of butyric-acid and spores of lactate fermenting anaerobes in the various groups. The individual analyses are plotted in fig. 2. A marked change in direction can be seen on the quality-curve at about 50.000 spores of anaerobic lactate fermenters per gram of silage. This phenomenon is reflected also in the butyric-acid curve.

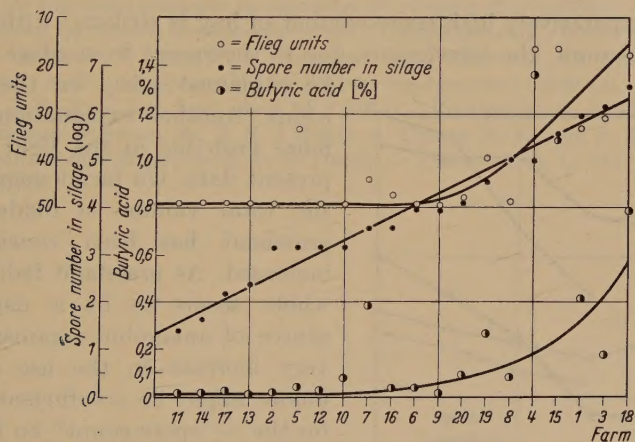


Fig. 2. The correlation between lactate fermenters and the butyric acid content of silage

To form a sound basis for discussing the infection-rate of milk by anaerobic spores from various sources at the place of production, the farms were put into different groups according to the number of spores in the milk samples. Five groups were thus made up. The hay farms formed a separate group for comparison. The silage farms were arranged in groups I—IV, group I with the lowest spore content in milk, group IV with the highest. The extremes of these groups coincide with the extremes when grouping on the basis of hygienic standard (see above), but the two central groups do not correspond. In the classification only the number

of lactate fermenters has been used, as these are known to be of direct harm in the dairy industry. The analytical data are shown in table 4 as quotients of group means indicated on fig. 3 and as total means based on results shown in Table 1.

Table 4. *Classification of farms, based on spore-content of milk*
Quotient of group means and total means

Group	Air	Milk	Silage	Faeces	Hay
Hay	0	0.02	—	0.15	0.78
I	0.46	0.02	0.01	0.22	0.43
II	0.69	0.26	0.07	1.47	0.69
III	1.54	1.07	1.33	1.37	1.13
IV	2.51	3.83	2.60	1.96	2.02

In fig. 3 the data have been plotted as logarithms of spore number in units of material given on the diagram. The spore content of milk is shown to correspond to the contents of silage, hay, air, and faeces.

The comparatively high spore-content of hay is striking: with such a high spore-count, the interference due to the spores from silage cannot be explained solely on the spore-count. Another explanation seems more probable in the light of the present data. On farms using silage the total volume of fodder from grassland has been considerably increased. As grassland fodder as a whole seems to be a dangerous source of anaerobic organisms, the very increase in the use of such fodder might be a sufficient reason for the —“spore-count” to increase to a deleterious level.

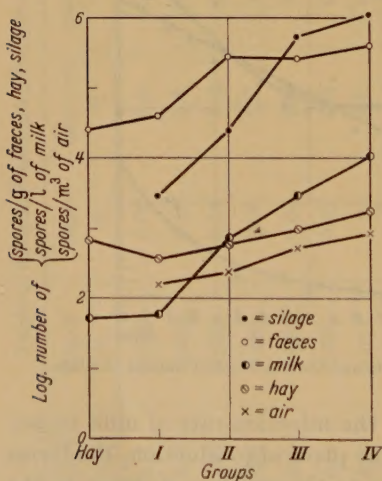


Fig. 3. Connexion between spore content of milk and silage, hay, faeces, and air. Group means

material from the soil during harvesting. The harmful effects of these organisms on milk production (which the present investigation has shown to originate not only from silage but also from other grassland products — usually collected by similar methods) thus might be entirely ascribable

to the harvesting-technique, which suggests that prophylaxis against infection should be undertaken not in the farmyard but on the field. Such factors as soil type, cultivation practice, etc., are probably also involved.

Summary

Samples from silage, hay, milk, air, and faeces were taken at 25 farms in mid-Sweden, farms with different hygienic standards of milk-production being chosen.

The correlation between fodder and milk-quality was investigated. The investigation was limited to the transfer of spores of anaerobes to the milk during feeding with silage of various qualities.

The role of grassland fodders other than silage in spore-infection of milk is discussed.

Literature

ALLEN, L. A., and J. HARRISON: *Ann. Appl. Biol.* **24**, 148 (1937). — VAN BEYNUM, J., and J. W. PETTE: *Versl. Landbouwk. Onderzoek.* **40**, 543 (1934). — FLIEG, O.: *Futterbau und Gärfutterbereitung* 1 und 2 (1938). — FRENS, A. M.: *The organization for European economic co-operation A.G. Project 224/15* (1954). — LIND, C.: 65. Beretning fra Statens forsøgsmejeri (1951). — MCCRADY et al.: *Water bacteriology* 1946. — NILSSON, G., and P. E. NILSSON: *Arch. Mikrobiol.* **24**, 412 (1956). — PEDERSEN, A. H.: 31. Beretning fra Statens forsøgsmejeri (1940/41). — ROSENBERGER, R. F.: *Proc. Soc. Appl. Bact.* **14**, 2 (1951). — RUSCHMANN G., and L. HARDER: *Die Futterkonservierung* Bd. 3, H. 1 (1931). — THOMÉ, K. E., and P. SWARTLING: *Medd. från Statens Mejeriförsök* No 38 (1952). — VIRTANEN, A. I.: *Zbl. Bakter.* **95**, 492 (1936/37).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen)

Über Hemmstoffwirkung und Resistenzbildung bei Bakterien*

Von

DIETER CLAUS

Mit 16 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. März 1956)

Mit der Entdeckung der Antibiotica hat das Studium wachstumshemmender Stoffe und deren Einwirkung auf Bakterien zunehmende Bedeutung erlangt. Untersuchungen mit den verschiedensten Hemmstoffen ergaben dabei, daß der Wachstumsverlauf einer Bakterienrein-
kultur von verschiedenen Hemmstoffen in unterschiedlicher Weise beeinflußt wird. Die gleiche Erscheinung zeigt sich bei der Einwirkung eines bestimmten Hemmstoffes auf verschiedene Bakterien. Bei einer graphischen Darstellung des Wachstumsverlaufs erhält man so Kurven-

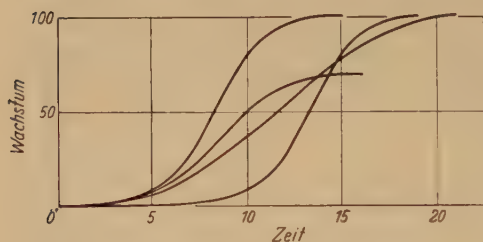


Abb. 1. Bakterien-Wachstumskurven unter Hemmstoffeinwirkung. Linke Kurve ohne Hemmstoff (schematisch)

bilder von verschiedenartigem Aussehen, wie dies in Abb. 1 schematisch aufgezeichnet ist. Ein solches Kurvensystem findet sich auch beim Vergleich des Wachstumsverlaufes unter der Wirkung verschiedener Nährstoffkonzentrationen (vgl. A. RIPPEL-BALDES, 1955 S. 155).

Zur Deutung dieser Befunde werden in der Literatur die mannigfaltigsten Gründe angeführt (FLOREY u. Mitarb., 1949), wobei vor allem auf die Möglichkeit einer unterschiedlichen Beeinflussung der einzelnen Wachstumsphasen hingewiesen wird. Während so durch einen Hemmstoff vor allem die lag-Phase verlängert werden soll, scheint bei anderen Stoffen die Hemmwirkung hauptsächlich die logarithmische oder stationäre Phase des Wachstums zu betreffen. Häufig werden die auftretenden Unterschiede durch verschiedenartige Wirkungsmechanismen zu erklären versucht, obgleich über diese Mechanismen nur sehr wenig bekannt ist.

* Teilergebnisse einer Dissertation „Über Ursachen und Auswirkung des unterschiedlichen Anpassungsvermögens der Bakterien an Hemmstoffe“ der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen (1955).

Schließlich spricht man in einigen Fällen von einer Verschiedenheit im Anpassungsvermögen an einen bestimmten Hemmstoff, wobei die Unterschiede durch den Verlauf der Wachstumskurven charakterisiert werden.

Das unterschiedliche Verhalten der Bakterien unter Hemmstoffeinwirkung sollte in der vorliegenden Arbeit auf breiterer Basis untersucht werden. Die Untersuchungen befassen sich zunächst mit der Frage, wie weit die Art des Wachstumsverlaufs einer Bakterienkultur unter Hemmstoffeinwirkung ein konstantes Merkmal ist. Von Beobachtungen während dieser Versuche ausgehend wurden dann Untersuchungen über die Ursachen des unterschiedlichen Wachstumsverlaufs unter Hemmstoffeinfluß angestellt und die Ergebnisse dieser Versuche schließlich zur Erklärung weiterer, bei Hemmstoffeinwirkung auf Bakterien auftretenden Erscheinungen herangezogen.

Methodik

Organismen. Für die Untersuchungen wurden *Bact. coli*, *Staph. aureus*, *Bact. lactis aerogenes*, *Bact. prodigiosum* (farbloser Stamm) und *Proteus vulgaris* herangezogen. Diese Organismen wurden gewählt, weil sie einerseits (mit Ausnahme von *Staph. aureus*) mit Ammoniumsalzen als Stickstoffquelle auskommen können, andererseits für Trübungsmessungen gut geeignet sind. Zu Beginn der Untersuchungen wurden Einzell-Kulturen angelegt.

Nährlösungen. Die Hauptnährlösung hatte folgende Zusammensetzung: NaCl 0,5%, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,02%, K_2HPO_4 0,2%, Glucose 1%, Bacto Difco Pepton 0,75%. Der pH-Wert betrug nach Sterilisation bei 1,2 atü 7,0. Bacto Difco Pepton wurde in verschiedenen Versuchsreihen durch andere Stickstoffverbindungen ersetzt. Die Menge dieser Stoffe wurde so gewählt, daß die Nährlösungen im N-Gehalt übereinstimmten. Die durch Veränderung der Hauptnährlösung auftretenden pH-Verschiebungen wurden durch entsprechende Reaktionseinstellung vor der Sterilisation ausgeglichen.

Hemmstoffe. Als bakterienhemmende Stoffe wurden verwendet: Phenol, 8-Oxychinolin, Rivanol, Acridinorange, Natriumazid, Sublimat, Kupfersulfat, Patulin, Achromycin (= Aureomycin), Terramycin, Chloromycetin, Penicillin und Sulfathiazol.

Impfmateriail. Um zu exakten Versuchsergebnissen zu gelangen, mußte besonderes Augenmerk auf das Impfmateriail gelegt werden. Zur Aufrechterhaltung eines konstanten Testmaterials wurde nach den Verfahren der Antibioticaforschung vorgegangen (HENNEBERG, 1947). In einzelnen Versuchsreihen mußten die durch Anwendung verschiedener N-Quellen möglichen störenden Einflüsse auf die Versuchsergebnisse ausgeschaltet werden. Hierzu wurden die zur Impfung verwendeten Kulturen über 5 Passagen hinweg auf derselben Nährlösung vorkultiviert, bei der eine Beimpfung erfolgte. Die Einhaltung einer bestimmten Zellzahl wurde dadurch erreicht, daß Impfkulturen bestimmten Alters angewandt wurden. Die zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Zellzahlunterschiede, bedingt durch die unterschiedliche Ernährung der einzelnen Reihen, wurden durch entsprechendes Verdünnen der betreffenden Kulturen ausgeglichen.

Wachstumsmessungen. Doppelt konzentrierte Nährlösung wurde bei 1,2 atü sterilisiert und anschließend mit einer 24 Std alten, entsprechend verdünnten Bakterienkultur beimpft. Durch sterile Abfüllung wurden jeweils 3 cm³ dieser Lösung in Röhrchen gebracht, die bereits 3 cm³ ebenfalls doppelt konzentrierte, sterile

Hemmstofflösung enthielten. Hierdurch war eine größtmögliche Gleichmäßigkeit in der Verteilung der Einsaat zu erzielen. 6 Röhrchen wurden je Hemmstoffkonzentration angesetzt, je eines davon diente zur pH-Überprüfung vor der Bebrütung. Diese erfolgte entsprechend den Optimumtemperaturen der Organismen.

Um den Wachstumsverlauf verfolgen zu können, wurden die Versuche teilweise mit Hilfe der Trübungsmessung ausgewertet. Die Zuverlässigkeit dieser Methode hinsichtlich der Übereinstimmung von Trübungsgrad und Keimzahl während des ganzen Wachstums wurde als gegeben angenommen, nachdem in der Literatur über die ausreichende Genauigkeit dieser Beziehungen berichtet wird (ESTOR, 1927; FOSTER, 1942; RADLER, 1955). Als Meßgerät wurde das lichtelektrische Becherglas-Kolorimeter nach RIEHM-LANGE herangezogen, das Messungen in Röhrchen durch einen angefertigten Einsatz mit enger Spaltblende ermöglichte.

Dem störenden Absetzen der Zellen wurde zunächst durch kräftiges Aufschütteln der Röhrchen zum Meßzeitpunkt entgegnet. Dies hatte jedoch in vielen Fällen eine Beeinflussung des Wachstumsverlaufs, vornehmlich gegen Ende der logarithmischen Phase, zur Folge. Diese Störung konnte dadurch umgangen werden, daß in jedes Röhrchen ein Rührstäbchen (etwa 1 cm Länge) gegeben wurde. Zum Meßzeitpunkt konnte so eine schnelle und gleichmäßige Trübung durch kurzes Aufstellen der Röhrchen auf einen Magnetrührer erzielt werden. Die Messungen erfolgten in Abständen von 1–4 Std.

Atmungsmessungen wurden mit Hilfe der Warburg-Apparatur, Modell V der Firma B. Braun, Melsungen, durchgeführt. Als Manometer dienten Doppelcapillارانometer, als Gefäße wurden solche mit seitlichen Ansätzen verwendet.

Die Sauerstoffaufnahme wurde mit Hilfe der Messung der Druckänderung in Gegenwart von KOH nach der Formel $x = h \cdot k$ bestimmt (h = Druckdifferenz, k = Gefäßkonstante). Über die Ableitung dieser Formel und über weitere theoretische und praktische Fragen der manometrischen Technik wird auf UMBREIT u. Mitarb. (1951) verwiesen.

Die manometrischen Versuche wurden folgendermaßen durchgeführt: Als Impfmateriale diente eine genau 24 Std alte Flüssigkeitskultur. Diese wurde abzentrifugiert und anschließend mit einem Teil des Zentrifugats 25 cm³ sterile Nährlösung beimpft. Die Impfmenge war so bemessen, daß 1 cm³ Versuchsnährlösung etwa 10⁸ Zellen enthielt. Die Reaktionsgefäße erhielten 2 cm³ dieser beimpften Nährlösung, der seitliche Ansatz enthielt 0,1 cm³ der entsprechenden Hemmstofflösung (Hemmstoffe in Phosphatpuffer gelöst), die Kontrolle 0,1 cm³ reinen Phosphatpuffer. Der Zusatz der Hemmstoffe erfolgte zu Anfang der logarithmischen Wachstumsphase, deren Beginn durch Vorversuche festgestellt wurde. Die Werte der Druckabnahmen wurden in Abständen von 30 min abgelesen, die Versuchstemperatur entsprach den Optimumtemperaturen der Bakterien.

Lebendzellzahl-Bestimmung. Zur Bestimmung der vermehrungsfähigen Zellen in Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration wurden 8 cm³ hemmstoffhaltiger Nähragar mit 2 cm³ einer Bakteriensuspension vermischt. Die Zahl der in dieser Suspension enthaltenen Zellen wurden durch entsprechendes Verdünnen der Ausgangskultur so gewählt, daß auf den Platten bis 300 Kolonien erschienen. Während bei den niedersten Hemmstoffkonzentrationen hohe Verdünnungsstufen notwendig waren, wurden bei hohen Hemmstoffkonzentrationen 2 · 10⁸ Zellen als Impfmateriale gegeben. Die Kolonienzahl wurde nach 4-tägiger Bebrütung ausgezählt und die Zahl der gegen die einzelnen Hemmstoffkonzentrationen resistenten Zellen der angewandten Verdünnungsstufe entsprechend berechnet. Von jeder geprüften Konzentration wurden 5 Parallelplatten ausgezählt und die Durchschnittszahlen für die Darstellungen verwendet.

Ergebnisse

Der Einfluß der Stickstoffernährung auf die Wirkung von Hemmstoffen bei Bakterien

Da bekannt ist (Literatur bei FLOREY u. Mitarb., 1949), daß die Stickstoffernährung einen wesentlichen Einfluß auf die Empfindlichkeit der Mikroorganismen gegenüber Hemmstoffen ausüben kann, wurden zunächst Versuche mit verschiedenen Stickstoffquellen angestellt.

In Tab. 1 sind die Grenzkonzentrationen einiger Hemmstoffe in Abhängigkeit von verschiedenen Stickstoffquellen zusammengestellt. Mit zunehmender Wachstumsgeschwindigkeit, bedingt durch die Güte der jeweiligen Stickstoffverbindung, werden steigende Hemmstoffkonzentrationen benötigt, um eine minimale Wachstumshemmung zu erreichen. Als Vermehrungsgeschwindigkeit wird dabei der Anstieg der Wachstumskurve während der logarithmischen Phase gewertet. Durch Konzentrationsänderung der Stickstoffquellen konnte dagegen keine wesentliche Änderung der Hemmstoffempfindlichkeit beobachtet werden.

Nachdem bestätigt war, daß die Empfindlichkeit der Organismen gegenüber Hemmstoffen ohne weiteres verändert werden kann, konnte der eingangs gestellten Frage nach der Konstanz des Verlaufs der Hemmungskurven weiter nachgegangen werden.

Die Ergebnisse für *Bact. coli* sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Da es auf den Verlauf der Wachstumskurven ankam, sind nicht einzelne Meßwerte aufgeführt, sondern der Verlauf der Kurven bildlich angedeutet. Die auftretenden Kurvenbilder konnten einer der drei in Abb. 1 schematisch dargestellten Wachstumskurven zugeordnet werden. Die Stickstoffverbindungen sind in der Tabelle ihrer Güte entsprechend angeordnet. So kann die eingetretene Veränderung des Hemmungskurvenverlaufs in Abhängigkeit von der Qualität der Stickstoffquelle sofort erkannt werden. Zwar bestehen keine direkten Beziehungen zwischen der Kurvenverlauf-Abänderung und der Vermehrungsgeschwindigkeit der Bakterien, doch läßt sich allgemein erkennen, daß mit abnehmender Güte der Stickstoff-Quelle die Art der Wachstumsbeeinflussung sich demjenigen Kurvenbild nähert, bei dem gegenüber der Kontrolle vor allem eine Beeinflussung der logarithmischen und stationären Phase des Wachstums zu erkennen ist. Entsprechende Ergebnisse zeigten Versuche mit *Bact. lactis aerogenes* und *Bact. prodigiosum*.




Die Versuchsergebnisse lassen folgende Erklärungen zu: 1. die Hemmstoffbeeinflussung der verschiedenen Wachstumsphasen wird durch die Art der N-Quelle bestimmt, oder 2. bei verschiedener N-Ernährung kann für den unterschiedlichen Kurvenverlauf ein verschiedenartiger Wirkungsmechanismus verantwortlich gemacht werden, oder 3. die Anpassung der Bakterien an einen Hemmstoff ist von der N-Quelle abhängig.

Tabelle 1. Minimale Grenzkonzentrationen bei verschiedener Stickstoffernährung

N-Quelle	Vermehrungs- geschw. aus- gedrückt durch Anstieg log-Phase	Minimalhemmende Grenzkonzentration in γ/cm^3					
		Phenol	HgCl ₂	Rivanol	Terramycin	Patulin	8-Oxychinolin
<i>Bact. coli</i>							
Bacto Difco Pepton	63	800	1	2,5	3	1,2	2,0
Pepton S Brunnengr.	62	750	1	2,5	2,8	1,5	2,2
Pepton Witte.	50	600	0,8	2,0	2,0	0,8	1,5
Asparagin	50	650	0,8	2,0	1,8	—	1,5
Glutaminsäure	38	410	0,5	1,5	—	0,5	0,8
Glykokoll	37	400	0,4	1,5	8	—	0,75
Harnstoff	34	420	0,4	1,5	0,8	—	—
NH ₄ Cl	33	400	0,3	1,5	0,5	0,5	0,5
Tryptophan	24	250	0,10	0,8	0,4	—	—
Leucin	24	200	0,15	1,0	0,3	0,2	0,3
<i>Bact. lactis aerogenes</i>							
Pepton S Brunnengr.	53	—	—	0,7	0,1	1,5	1,4
Bacto Difco Pepton	48	—	—	0,7	0,1	1,5	2,0
Pepton Witte.	44	—	—	0,6	0,15	1,2	1,2
Asparagin	39	—	—	0,5	0,08	1,5	1,5
Leucin	29	—	—	0,6	0,05	—	1,0
NH ₄ Cl	29	—	—	0,4	—	1,0	1,0
Glutaminsäure	29	—	—	0,4	0,05	—	—
Harnstoff	28	—	—	0,5	—	—	—
Glykokoll	26	—	—	0,5	—	0,9	0,9
Tryptophan	11	—	—	0,2	0,01	0,5	0,6

Tabelle 2.

Typen der Wachstumskurven bei verschiedenen Hemmstoffen und Stickstoffquellen.
(Die Zahlen in () geben die Vermehrungsgeschwindigkeit der Bakterien an; s. Tab. 1)

			
<i>Bact. coli</i>			
Phenol	—	—	alle N-Quellen
Sublimat	—	Bacto P. (63) Pepton S (62) Witte P. (50) Asparagin (50) Harnstoff (34)	Glutamins. (38) NH ₄ Cl (33) Leucin (24)
8-Oxychinolin	—	Bacto P. (63) Pepton S (62) Glutamins. (37)	alle anderen N-Quellen
Rivanol	Bacto P. (63) Pepton S (62)	Witte P. (50) Asparagin (50) Glykokoll (37)	Glutamins. (38) Harnstoff (34) NH ₄ Cl (33)
Aureomycin	—	Bacto P. (63) Pepton S (62)	alle anderen N-Quellen
Terramycin	—	—	alle N-Quellen
Chloromycetin	—	Bacto P. (63) Pepton S (62) Asparagin (50) Glykokoll (37)	Witte (50) Glutamins. (38) Harnstoff (34) NH ₄ Cl (33)
Patulin	—	Bacto P. (63) Pepton S (62) Witte P. (50) Glutamins. (38)	Asparagin (50) Glykokoll (37) Harnstoff (34) NH ₄ Cl (33)
Acridinorange	Bacto P. (63) Pepton S (62)	Witte (50) Asparagin (50) Harnstoff (34)	Glykokoll (37) NH ₄ Cl (33) Leucin (24)
Sulfathiazol	—	Bacto P. (63) Pepton S (62)	alle anderen N-Quellen

Die folgenden Untersuchungen zeigten, daß für den Zusammenhang zwischen Wachstumsverlauf gehemmter Bakterienkulturen und der N-Ernährung Änderungen im Anpassungsvermögen der Bakterien verantwortlich gemacht werden müssen.

Die unterschiedliche Einwirkung der Hemmstoffe auf die Bakterienatmung und deren Ursache

Nach einer Beobachtung während der vorangehenden Versuche mit *Bact. coli* fiel auf, daß die durch Rivanol hervorgerufene zeitliche Verzögerung des Beginns einer meßbaren Trübung bei diesem Bakterium

nicht einer Verlängerung der lag-Phase zugeschrieben werden kann. Im Plattentest zeigte sich nämlich, daß mit zunehmender Konzentration des Hemmstoffes ein zunehmender Teil der eingesäten Zellen vermehrungsunfähig blieb. Bei der weiteren Überprüfung dieses Ergebnisses zeigte sich schließlich, daß die im Plattentest erhaltenen, mit steigender Konzentration des Rivanolis abnehmenden Zellzahlen einer normalen Verteilung weitgehend entsprechen.

In neuerer Zeit berichten lediglich HUGHES (1952) und EAGLE u. Mitarb. (1952) über ähnliche Ergebnisse bei Penicillin und Streptomycin. Weitere Angaben konnten nur älteren Arbeiten entnommen werden. So berichten z. B. PAUL u. KRÖNIG (1896, 1897), daß mit steigender Giftkonzentration nicht ein bestimmter Punkt erreicht wird, an dem alle Zellen getötet werden, daß vielmehr eine allmähliche Tötung stattfindet. Ähnliche Beobachtungen an Bakterien und Pilzsporen erwähnt STEVENS (1898). Diese Angaben über die Empfindlichkeitsverteilung innerhalb von Bakterienkulturen stehen im Gegensatz zu Arbeiten von DEMEREC (1948), BRYSON u. DEMEREC (1950) u. a., wonach der Durchschnitt der Zellen einer Population einheitliche Empfindlichkeit besitzt, daneben aber wenige resistere Zellen vorhanden sind, die durch spontane Mutation entstanden sind.

Da diese Theorie der Bildung spontaner Resistenzmutanten heute allgemein für alle Hemmstoffe als gültig anerkannt wird, schien es wichtig, genauere Untersuchungen mit verschiedenen Hemmstoffen und Bakterien hinsichtlich der Empfindlichkeitsverteilung innerhalb der Populationen anzustellen. Gleichzeitig interessierte die Frage, wie sich eine unterschiedliche Resistenzverteilung innerhalb der einzelnen Populationen auf den Wachstumsverlauf einer Bakterienkultur auswirkt.

Die normalen Atmungskurven einiger Bakterien

Für diese Untersuchungen war es wünschenswert, eine Methode anzuwenden, bei der auch eine eventuelle Abtötung der eingesäten Zellen durch einen Hemmstoff erkannt werden kann. Neben der relativ ungenauen und vor allem für größere Versuchsreihen umständlichen Methoden der Lebendzellzählung eignet sich zur Verfolgung des Wachstumsverlaufs hervorragend die Methode der fortlaufenden manometrischen Messung des Sauerstoffverbrauchs von Bakterienkulturen, wie sie vor allem von HIRSCH (1944/45) für die Einwirkung von Penicillin und Sulfonamiden auf Bakterien ausgearbeitet wurde. Hierbei ist es möglich, die Wirkung eines Stoffes unmittelbar nach dessen Zusatz abzulesen und dessen weitere Einwirkung fortlaufend zu verfolgen. Durch die Messung der Atmungsgrößen (Sauerstoffverbrauch je Zeiteinheit) sich vermehrender Bakterien läßt sich nach HIRSCH ein anschauliches Bild vom Verlauf des Wachstums gewinnen (Beginn, Geschwindigkeit, Umfang und Stillstand). Wählt man im Koordinatensystem die Ordinate logarithmisch, dann verläuft die Atmungskurve entsprechend der logarithmischen Wachstumsphase geradlinig und fällt nach Erreichen eines Maximums ab. Der Verlauf einer solchen Atmungskurve ist natürlich von verschiedenen Faktoren abhängig, von denen die für die eigenen Untersuchungen wichtigen im folgenden kurz beschrieben werden.

Verschiedene Bakterien haben unter optimalen Bedingungen eine unterschiedliche Generationsdauer. Dies drückt sich im unterschiedlichen Anstieg der Atmungskurven aus (Abb. 2). Das gleiche Bild zeigen Atmungskurven eines bestimmten Bakteriums, die bei verschiedener

Temperatur aufgenommen werden (Abb. 3). Die Generationsdauer nimmt mit fallender Temperatur stark zu, so daß schließlich Atmungskurven erhalten werden, die denen ruhender Kulturen nahekomen. Eine Änderung der Einsaatmenge drückt sich in einer parallelen Verschiebung der Atmungskurven aus. Der Zeitpunkt der ersten meßbaren Atmungsgrößen ist der verringerten Einsaat entsprechend zeitlich verzögert (Abb. 4).

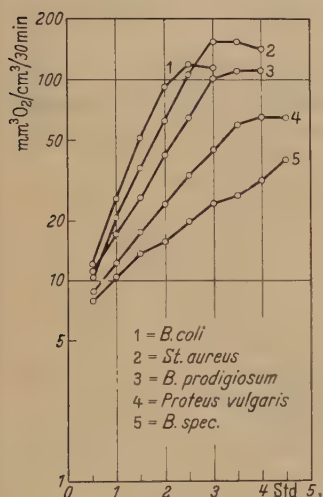


Abb. 2.
Atmungskurven verschiedener Bakterien

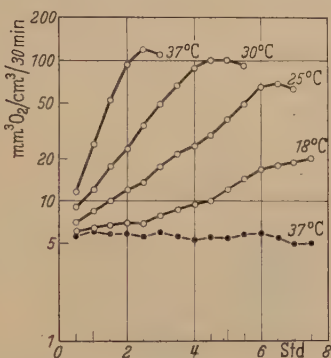


Abb. 3. *Bact. coli*, Atmungskurven bei verschiedener Temperatur. •—•—• Ruhende Kultur

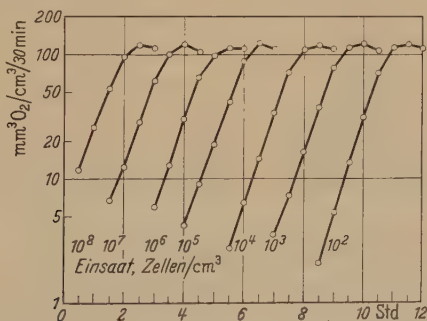


Abb. 4. *Bact. coli*, Atmungskurven bei verschiedener Einsaatmenge

Einwirkung von Hemmstoffen auf die Bakterienatmung

Nachdem in Vorversuchen festgestellt worden war, welcher Konzentrationsbereich für eine Atmungshemmung in Frage kam, wurden den sich vermehrenden Bakterien Hemmstoffe in abgestuften Konzentrationen zu dem erwähnten Zeitpunkt (in den Abbildungen durch \downarrow gekennzeichnet) zugegeben.

Abb. 5 zeigt die Atmungskurven von *Bact. coli* unter der Einwirkung von Phenol. Mit steigender Konzentration des Hemmstoffes nimmt der

Neigungswinkel der Atmungskurven ab. Dies bedeutet eine Herabsetzung der Vermehrungsgeschwindigkeit. Schließlich wird durch 2 mg/cm^3 Phenol die Vermehrung vollständig gehemmt, die Atmungskurve verläuft entsprechend der ruhender Bakterien. Steigert man die Konzentration weiter, so sterben die Zellen der Konzentration entsprechend mehr oder weniger schnell ab.

Patulin (Abb. 6) beeinflusst in niederen Konzentrationen diesen Bakterienstamm entsprechend dem vorangehenden Beispiel. Mit steigender Konzentration dieses Stoffes variiert der Anstieg innerhalb der

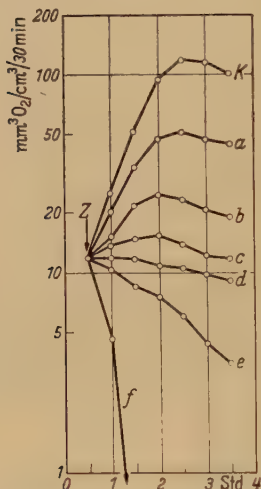


Abb. 5. *Bact. coli*, Atmungsbeeinflussung durch Phenol. Kurve *a* $1,2 \text{ mg/cm}^3$, Kurve *b* $1,5 \text{ mg/cm}^3$, Kurve *c* $1,8 \text{ mg/cm}^3$, Kurve *d* $2,0 \text{ mg/cm}^3$, Kurve *e* $2,3 \text{ mg/cm}^3$, Kurve *f* $2,5 \text{ mg/cm}^3$



Abb. 6. *Bact. coli*, Atmungsbeeinflussung durch Patulin. Kurve *a* $6 \gamma/\text{cm}^3$, Kurve *b* $10 \gamma/\text{cm}^3$, Kurve *c* $15 \gamma/\text{cm}^3$, Kurve *d* $20 \gamma/\text{cm}^3$, Kurve *e* $30 \gamma/\text{cm}^3$, Kurve *f* $40 \gamma/\text{cm}^3$, Kurve *g* $50 \gamma/\text{cm}^3$, Kurve *h* $60 \gamma/\text{cm}^3$

einzelnen Atmungskurven von Meßpunkt zu Meßpunkt, so daß diese ein stufenförmiges Aussehen erhalten. Auch hinsichtlich der maximalen Atmungsgrößen unterscheidet sich die Patulinwirkung von der des Phenols. Die Maxima werden zwar ebenfalls mit steigender Hemmstoffkonzentration geringer, jedoch zu einem der ansteigenden Konzentration entsprechenden späteren Zeitpunkt erreicht.

Wesentlich ausgeprägter ist unter dem Einfluß von Acridinorange (Abb. 7)¹ die zeitliche Verzögerung der maximalen Atmungsgrößen, die selbst bei anfänglichem Abfall der Atmungskurven die Werte der Kontrolle erreichen können.

¹ In dieser und den folgenden Abbildungen fallen die nicht meßbaren Werte (unter $1 \text{ mm}^3 \text{ O}_2/\text{cm}^3/30 \text{ min}$) aus.

Während bei den bisher angeführten Hemmstoffen nur ein flacher Kurvenanstieg zu verzeichnen war, ändert sich das Bild völlig bei der Einwirkung von Kupfersulfat (Abb. 8). Selbst bei starken Konzentrationen, bei denen nach Zusatz des Hemmstoffes die Atmungsgrößen sehr

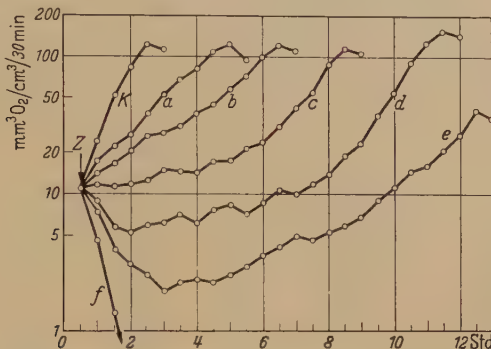


Abb. 7. *Bact. coli*, Atmungsbeeinflussung durch Acridinorange. Kurve a 20 γ/cm^3 , Kurve b 35 γ/cm^3 , Kurve c 65 γ/cm^3 , Kurve d 120 γ/cm^3 , Kurve e 200 γ/cm^3 , Kurve f 250 γ/cm^3

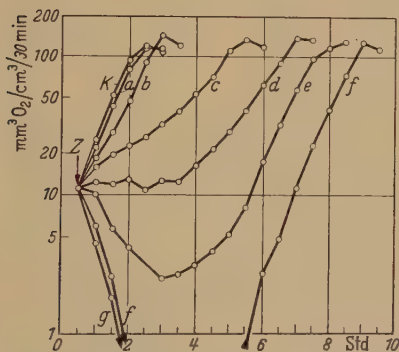


Abb. 8. *Bact. coli*, Atmungsbeeinflussung durch Kupfersulfat. Kurve a 2 γ/cm^3 , Kurve b 6 γ/cm^3 , Kurve c 15 γ/cm^3 , Kurve d 30 γ/cm^3 , Kurve e 60 γ/cm^3 , Kurve f 100 γ/cm^3 , Kurve g 140 γ/cm^3

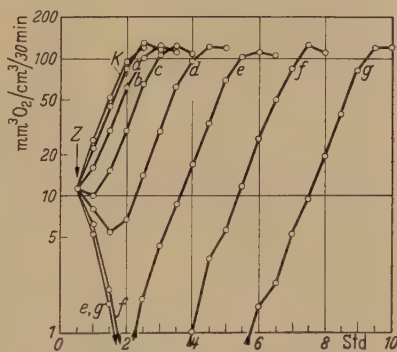


Abb. 9. *Bact. coli*, Atmungsbeeinflussung durch Rivanol. Kurve a 4 γ/cm^3 , Kurve b 10 γ/cm^3 , Kurve c 30 γ/cm^3 , Kurve d 70 γ/cm^3 , Kurve e 120 γ/cm^3 , Kurve f 180 γ/cm^3 , Kurve g 300 γ/cm^3

rasch abfallen, steigen diese wieder an und verlaufen dann parallel zur Kontrolle.

Als extremer Fall kann die Beeinflussung durch Rivanol angesehen werden. Entsprechend der Konzentration fallen die Atmungsgrößen mehr oder weniger steil ab, gefolgt von einem plötzlichen Wiederanstieg. Das so erhaltene Kurvenbild (Abb. 9) entspricht weitgehend dem in Abb. 4 dargestellten Versuch der Atmungskurven abgestufter Einsaatmengen.

Die weiteren Untersuchungen über die Atmungsbeeinflussung von *Bact. coli* mit einer Anzahl anderer Hemmstoffe zeigten, daß die in Abb. 5—9 dargestellten Kurvenbilder immer wieder auftreten. Das

gleiche gilt für Atmungskurven anderer Bakterien unter dem Einfluß dieser Stoffe. Diese Befunde ermöglichen es, auf die graphische Darstellung weiterer Versuche zu verzichten. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengefaßt. Hierbei sind die einzelnen Kurventypen mit römischen Ziffern bezeichnet, wobei I der Abb. 5, II der Abb. 6, III der Abb. 7 und IV der Abb. 9 weitgehend entsprechen. Bei Stoffen, die nur eine bacteriostate Wirkung besitzen, konnte allerdings der in den Abbildungen dargestellte Abfall der Atmungsgrößen in keinem Falle beobachtet werden.

Tabelle 3. *Art der Atmungsbeeinflussung*
Erklärung im Text

	<i>Bact. coli</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>Bact. lactis</i>	<i>Bact. prodigiosum</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
Phenol, bactericid	I	II	III	III	II
Sublimat, bactericid . . .	II	III	IV	IV	I
8-Oxychinolin, bactericid .	—	II	II	III	II
Rivanol, bactericid	IV	II	III	II	III
Aureomycin, bacteriostat .	II	I	II	III	II
Terramycin, bacteriostat .	I	II	III	IV	II
Chloromycetin, bacteriostat	II	III	III	I	III
Patulin, bactericid	II	IV	III	II	IV
Acridinorange, bactericid .	III	IV	II	II	IV
Sulfathiazol, bacteriostat .	II	II	I	III	II

Die Atmung verschiedener Bakterienarten wird demnach durch ein und denselben Hemmstoff in sehr unterschiedlicher Weise beeinflußt, auch von solchen Stoffen, denen man auf Grund ihrer nahen chemischen Verwandtschaft einen gleichen Wirkungsmechanismus zuschreiben könnte. Nicht in diese Gruppe einreihbar waren Atmungskurven, die unter der Wirkung von Penicillin oder Natriumazid entstanden.

Die Ursachen des Abfalls der Atmungsgrößen nach der Zugabe von Hemmungsstoffen

Über die Ursachen des Verlaufs, vor allem über den nach Hemmstoffzusatz beobachteten Abfall der Atmungskurven, konnten nach den vorangehenden Versuchsergebnissen keine näheren Aussagen gemacht werden. Neben einer Abtötung der ganzen oder eines Teiles der Population konnte eine selektive Schädigung der Atmungsfermente einen Abfall der Atmungsgrößen bedingen, ohne daß dabei andere physiologische Leistungen der Zellen direkt beeinträchtigt werden. Somit schien es wichtig, die Beziehungen zwischen den Atmungsgrößen und den dazugehörigen Keimzahlen nachzuprüfen.

Die vorliegenden Arbeiten zeigen, daß innerhalb der logarithmischen Wachstumsphase die Atmungsgrößen der Keimvermehrung direkt proportional gehen (HIRSCH, 1936; GREIG u. HOGERHEIDE, 1941), sofern die Keimvermehrung nephelemetrisch verfolgt wird.

Aus diesem Grunde wurden ebenfalls Vergleiche zwischen Trübungsgrad und Atmungsgrößen zu verschiedenen Zeitpunkten angestellt. Tab. 4 zeigt einen Ausschnitt der Ergebnisse.

Bei der Einwirkung von Hemmstoffen auf Bakterien war natürlich von vornherein, sofern man den Atmungsabfall zunächst auf eine Abtötung zurückführte, ein konstantes Verhältnis zwischen Trübungsgrad und

Tabelle 4. *Atmungs- und Trübungsvergleich wachsender Bakterien*
(Ende der logarithmischen Wachstumsphase mit → gekennzeichnet)

Bacterium	Dauer des Wachstums Std	O ₂ -Aufnahme mm ³ /cm ³ /30 min	Trübungsgrad	O ₂ -Aufnahme Trübungsgrad
<i>Bact. coli</i>	2	3,4	1,7	2,0
	2,5	7,0	3,9	1,8
	3	17,0	8,0	2,1
	3,5	34,4	17,7	1,9
	4	75,0	37,0	2,0
	4,5	124	64	1,9
	→ 5	126	86	1,5
	5,5	110	100	1,1
<i>Staph. aureus</i>	2	3,8	1,2	3,2
	2,5	6,7	1,9	3,5
	3	11,0	6	3,0
	3,5	22,4	6,4	3,5
	4	39,0	11,0	3,5
	4,5	67,0	19,5	3,5
	5	115	33,5	3,4
	→ 5,5	192	60,0	3,2
	6	215	82	2,6
	6,5	203	100	2,0

Atmungsgrößen nicht zu erwarten. Sehr unwahrscheinlich war auch eine Übereinstimmung zwischen Keimzahl und Atmungsgrößen, da das mikroskopische Bild sehr oft eine durch die Hemmstoffe verursachte Größenänderung der Einzelzellen zeigte. Da es darauf ankam, zu entscheiden, ob der Abfall der Atmungsgrößen auf einer teilweisen Abtötung der Population oder auf einer selektiven Schädigung der Atmungsfermente beruht, wurden weitere Versuche an ruhenden Kulturen unternommen. Dabei wurde vorausgesetzt, daß durch Hemmstoffe, welche die Atmung ruhender Zellen nicht beeinflussen, eine selektive Schädigung der Atmungsfermente ausgeschlossen werden kann.

Es zeigte sich, daß Hemmstoffe mit ausschließlich bacteriostatischer Wirkung in keinem Falle die Atmung ruhender Zellen beeinflussen. Dies war zu erwarten, denn bei wachsenden Kulturen konnte unter dem Einfluß dieser Stoffe niemals ein schroffer Atmungsabfall beobachtet werden.

Auch in Gegenwart bactericider Substanzen kann eine selektive Schädigung der Atmungsfermente ausgeschlossen werden. Der angewendeten

Konzentration entsprechend tritt ein mehr oder weniger großer Abfall der Atmungsgrößen nach Einwirkung des Stoffes ein. Anschließend verläuft die Atmungskurve jedoch wieder parallel der unbeeinflussten Kontrolle. Bestimmt man nun die Zellzahlen dieser mit verschiedenen Konzentrationen behandelten Kulturen, so zeigt sich zwischen den Atmungsgrößen, also hier zwischen dem Niveau der Atmungskurven und den dazugehörigen Zellzahlen, eine sehr gute Übereinstimmung. Tab. 5 gibt einen Ausschnitt dieser Ergebnisse. LIPSCHITZ (1923) berichtet über entsprechende Erscheinungen bei anderen Desinfektionsmitteln.

Tabelle 5

Bakterium	Hemmstoff γ/cm^3	O_2 -Aufnahme $\text{mm}^3/\text{cm}^3/30 \text{ min}$	Lebendzellzahl $\times 10^4$	Zellzahl
		2,5 Std nach Hemmstoffzugabe	Hemmstoffzugabe	O_2 -Aufnahme
<i>Bact. coli</i>	Rivanol			
	—	20	5	0,25
	6	14,7	4	0,27
	14	11,2	3,2	0,28
	20	9,5	2,5	0,26
	40	6,5	1,7	0,26
	80	3,6	1,0	0,26

Eine selektive Schädigung der Atmungsfermente kann so bei den untersuchten Hemmstoffen nur von untergeordneter Bedeutung sein. Der beobachtete Abfall der Atmungsgrößen kommt somit durch eine partielle Abtötung der Bakterienpopulationen zustande.

Heterogenität und Homogenität der Zellen

Die unterschiedliche Empfindlichkeit der Zellen einer Population gegenüber Hemmstoffen und deren Verteilung

Die Wichtigkeit der oben bereits erwähnten Empfindlichkeitsverteilung innerhalb einer Bakterienkultur war der Anlaß, sämtliche zu den Atmungsversuchen herangezogenen Hemmstoffe und Bakterien in dieser Hinsicht zu prüfen. Dabei konnte die Feststellung gemacht werden, daß alle Bakterienkulturen aus unterschiedlich empfindlichen Zellen zusammengesetzt sind, so daß mit steigenden Hemmstoffkonzentrationen ein zunehmender Teil der eingesäten Zellen vermehrungsunfähig bleibt. Die dabei erhaltenen Überlebenskurven kommen allgemein der Kurve einer Normalverteilung sehr nahe, wie dies die Abb. 10 erkennen läßt.

Die Unterschiede, die bei den einzelnen Hemmstoffen und Bakterien in der Empfindlichkeitsverteilung auftreten, drücken sich in der unterschiedlichen Variationsbreite aus, wie dies in Tab. 6 zum Ausdruck kommt. Die Variationsbreite wird dabei durch das Verhältnis der Konzentrationswerte für maximale und minimale Hemmung gekennzeichnet;

sie schwankt zwischen Werten von etwa 100 und 2 und bezieht sich auf eine Bakterienzahl von etwa $2 \cdot 10^8$ Zellen. Die absoluten Konzentrationswerte spielen hierbei natürlich keine Rolle.

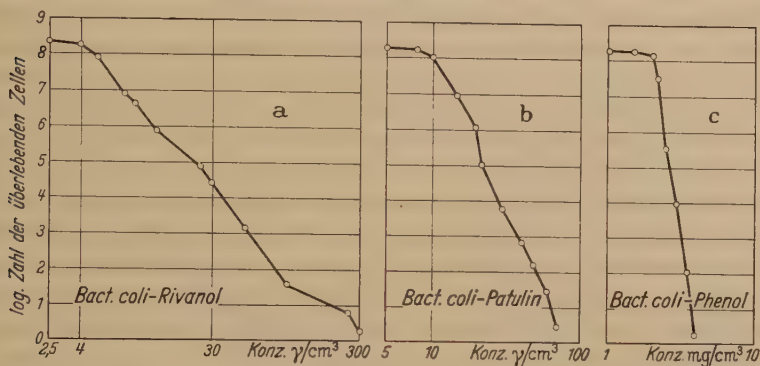


Abb. 10. *Bact. coli*, Zahl der Überlebenden in Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration

Die Empfindlichkeitsverteilung ist also außerordentlich verschieden. Im folgenden wird daher von Populationen mit unterschiedlicher Heterogenität gesprochen, Kulturen mit nur sehr geringer Variationsbreite werden als homogen bezeichnet. Die Heterogenität bezieht sich dabei natürlich immer nur auf einen bestimmten Hemmstoff.

Tabelle 6. Variationsbreite der Hemmstoffempfindlichkeit
(Erläuterung im Text)

	<i>Bact. coli</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>Bact. lactis</i>	<i>Bact. prodigiosum</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
Phenol	2,5	9	50	33,4	10
HgCl ₂	12	50	100	87,5	4
8-Oxychinolin	16	10,5	9	39	8,5
Rivanol	75	10	70	10	33,5
Aureomycin	11	2,7	7,5	51	8
Terramycin	2,5	9	41,5	75	8,3
Chloromycetin	10	50	25	2,5	7,1
Patulin	10	80	39	9,3	75
Acridinorange	41,5	100	9	11	91
Sulfathiazol	12	9	2,5	50	10

Die Zusammenhänge zwischen der Heterogenität von Bakterienkulturen und dem Verlauf der Atmungskurven unter Hemmstoffeinwirkung

Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse der Variationsbreiten mit der Art der Atmungsbeeinflussung (Tab. 3 und Tab. 6) ergibt sich eine deutliche Übereinstimmung; denn Populationen mit großer Variationsbreite gegenüber einem bestimmten Hemmstoff zeigen allgemein den Kurven-

typ IV, während umgekehrt homogene Kulturen einen Atmungsverlauf in der Art des Typs I ergeben. Dazwischen liegen Kurventyp II und III mit entsprechenden Variationsbreiten.

Wie kann diese Übereinstimmung der beiden Versuchsreihen erklärt werden? Betrachtet man hierzu zunächst eine Population mit nur geringer Variationsbreite in der Empfindlichkeit, so kann man annehmen, daß alle Zellen dieser praktisch homogenen Kultur durch den zugefügten Hemmstoff etwa in gleichem Maße beeinflusst werden. Die Vermehrungsgeschwindigkeit der Kultur wird gleichmäßig herabgesetzt, ein Bild, das dem erwähnten Kurventyp I (Abb. 5) entspricht. Bei Typ IV dagegen (Abb. 9) liegt eine sehr große Variationsbreite vor. Dies hat zur Folge, daß trotz Abtöten eines Teils der Ausgangspopulation ein Teil der Restpopulation von der angewandten Hemmstoffkonzentration völlig unbeeinflusst bleibt, während ein anderer Teil durch diese mehr oder weniger gehemmt wird. Das Verhältnis zwischen diesen letztgenannten Teilen wird sich mit zunehmend flachem Verlauf der Verteilungskurven zugunsten der ungehemmten Zellen verschieben, deren Atmungskurven dann nicht oder nur schwach von der gehemmten, zahlenmäßig geringen Restpopulation beeinflusst werden.

Zwischen diesen beiden Extremen ändert sich mit der Variationsbreite der Populationen der Verlauf der Atmungskurven derart, daß mit fallender Heterogenität die Zahl der völlig unbeeinflussten Zellen geringer wird, dadurch aber der Anteil der mehr oder weniger gehemmten Zellen an diesem Verlauf an Bedeutung rasch zunimmt. Der Anstieg der Kurven wird so zunächst flacher und beginnt erst, entsprechend der geringeren Anzahl der unbeeinflussten Zellen, später steiler zu werden. (Typ III, Abb. 7). Schließlich zeigt Kurventyp II (Abb. 6), daß schwache Heterogenität nur bei geringeren Konzentrationen der Hemmstoffe unbeeinflusste Zellen auftreten läßt. Mit steigender Konzentration jedoch wird die stationäre Wachstumsphase bei geringeren Atmungsgrößen erreicht, ein Zeichen, daß alle Zellen einer Beeinflussung unterliegen. Daß diese Atmungshemmung nicht bei allen Zellen gleich stark eintritt, läßt sich aus dem stufenförmigen Verlauf dieser Kurven entnehmen.

Hier können noch einige Beobachtungen angeführt werden über Bakterienstämme, die gegenüber verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen resistent waren (Anpassung durch Passagenkultur). Bei der Untersuchung solcher Stämme zeigte sich, daß mit steigender Resistenz die Art der Atmungsbeeinflussung, also der Kurventyp, sich ändert, gleichzeitig auch die Empfindlichkeitsverteilung innerhalb der Populationen, so daß schließlich homogene, maximalresistente Kulturen erhalten wurden. Diese Erscheinung ist allgemein verbreitet.

Im Zusammenhang mit obigen Ausführungen soll hier noch einmal kurz auf die Bedeutung der Ernährung für den Verlauf des Wachstums unter Hemmstoffeinwirkung zurückgekommen werden. Wenn auch die ein-

zelen Kurventypen der Atmungs- und Wachstumsversuche nicht unbedingt miteinander verglichen werden können, so läßt sich doch sagen, daß unter veränderten Ernährungsbedingungen nicht nur die natürliche Resistenz, sondern auch die Variationsbreite der Empfindlichkeit der Bakterienkulturen gegenüber Hemmstoffen verschieden ist. Durch eine optimale Stickstoffernährung wird diese Variationsbreite sehr gefördert.

Die unterschiedliche Heterogenität verschiedener Stämme einer Bakterienart gegenüber Hemmstoffen

Im Zusammenhang mit weiter unten angeführten Versuchen über die Wirkung verschiedener Einsaatmengen auf das Bakterienwachstum, bei denen nach Literaturangaben allgemein die Ergebnisse von Bakterienstamm zu Bakterienstamm variieren können, interessierte, wie weit die Heterogenität gegenüber Hemmstoffen bei verschiedenen Stämmen einer Art voneinander abweicht. Zu diesem Zweck wurden 12 Stämme von *Bact. coli* aus Wasser und Bodenproben verschiedener Herkunft isoliert und die Empfindlichkeitsverteilung gegenüber verschiedenen Hemmstoffen geprüft. Zur Identifizierung der Bakterien wurden die gewöhnlichen Tests für *Bact. coli* unternommen.

Die Variationsbreiten der isolierten Stämme (geprüft nach längerer Kulturdauer) gegenüber einem bestimmten Hemmstoff ist allgemein sehr unterschiedlich, in gewissen Grenzen scheint sie mit der natürlichen Resistenz der Stämme zusammenzuhängen. Denn die Variationsbreite ist oft am stärksten ausgebildet, wenn die minimalhemmende Konzentration einen relativ niederen Wert erreicht.

Daneben stellt sich eine bemerkenswerte Erscheinung heraus. Es handelt sich dabei um Unterschiede in der Variationsbreite von Stämmen, die direkt nach der Isolierung geprüft wurden und den gleichen Stämmen, deren Verteilung nach längerer Zeit nachgeprüft wurde. Dabei zeigte sich, daß mit steigender Anzahl der Überimpfungen die Heterogenität der frisch isolierten Stämme, die im allgemeinen gering zu sein scheint, zunehmen kann und schließlich ein konstantes Maximum erreicht. Dies zeigt, daß auch hinsichtlich der Hemmstoffresistenz die Verhältnisse in Kultur anormal sein können, wie dies ja auch für andere Fälle nachgewiesen wurde (z. B. in morphologischer Hinsicht, vgl. RIPPPEL-BALDES, 1949, S. 184*). Die zunehmende Variationsbreite mit steigender Güte der Stickstoffquelle weist in gleiche Richtung.

Zusammenhänge zwischen Heterogenität der Bakterienpopulationen und Resistenzbildung gegenüber Hemmstoffen

Untersuchungen über die Resistenzbildung von Bakterien gegenüber den verschiedensten bakterienhemmenden Stoffen sind vor allem in den letzten Jahren in sehr großem Umfang durchgeführt worden.

Bereits oben wurde erwähnt, daß heute allgemein die Theorie der spontanen Entstehung von Resistenzmutanten anerkannt wird. Die resistenten Zellen erscheinen danach im Laufe der Bakterienvermehrung als Spontanmutation, sie sind also in der zu testenden Ausgangskultur vorhanden. Durch einen Hemmstoffzusatz wird der größte Teil der Population abgetötet bzw. gehemmt, während die der geringen Mutationsrate entsprechenden wenigen resistenten Zellen zu weiterem Wachstum befähigt sind und sich so anreichern können. Diese Anschauungen beruhen vor allem auf den Untersuchungen von LURIA u. DELBRÜCK (1943), DEMEREC (1943, 1949), BRYSON u. DEMEREC (1950) u. a.

Unter den Gegnern dieser Theorie findet sich vor allem HINSHELWOOD (1946), der die Resistenzentstehung als Adaptation der Zellen an den Hemmstoff zu erklären versucht. Die Hemmstoffe wirken hierbei nicht als selektive Faktoren, vielmehr sollen durch sie die allgemein zu beobachtenden Empfindlichkeitsveränderungen direkt induziert werden, wobei diese Adaptation in allen Zellen einer Kultur eintreten kann. Vor allem wird in diesem Zusammenhang daraufhingewiesen (DAVIES, HINSHELWOOD u. PRYCE, 1944; EAGLE u. Mitarb., 1952), daß der Grad der Resistenz in den untersuchten Fällen mit der Hemmstoffkonzentration, bei der die resistenten Zellen herangewachsen sind, eng verknüpft ist. Während diese Befunde mit Hilfe der Adaptationstheorie ohne weiteres erklärt werden können (MANDELSTAM u. YUDKIN, 1952), muß bei der Annahme von Spontanmutationen eine sehr große Anzahl verschiedener Mutationsschritte gefordert werden, da sonst keine Beziehungen zwischen enggestaffelten Hemmstoffkonzentrationen und Resistenzgrad bestehen dürften. Gegen die Vielzahl von Mutationsschritten spricht aber die allgemein als gering angenommene Mutationsrate (vgl. hierzu die Ausführungen von ABRAHAM, 1953 und EAGLE u. Mitarb., 1952).

Überblickt man die vorangehenden Untersuchungen über den Verlauf der Atmungsbeeinflussung und die Empfindlichkeitsverteilung innerhalb einer Bakterienpopulation, so lassen sich ohne weiteres Zusammenhänge zwischen Resistenzbildung und dem Verhalten der Bakterienkultur aufzeigen. Es sei hier an die Tatsache erinnert, daß Stämme mit maximaler Resistenz in der Empfindlichkeit der Einzelzellen ziemlich homogen sind, ferner an die Beobachtung, daß in vielen Fällen nach Abtöten eines Teils der Ausgangskultur ein der unbeeinflussten Kontrolle entsprechendes Wachstum eintrat. Dies kann nur durch eine Resistenzbildung erklärt werden, nicht aber durch eine bloße Anreicherung der nicht abgetöteten Modifikanten.

Zur Methodik der folgenden Resistenzversuche muß hier Verschiedenes nachgetragen werden. Die unter Hemmstoffeinwirkung gewachsenen Organismen wurden nach Erreichen der maximalen Atmungsgrößen in sterile Zentrifugenröhrchen übertragen, abzentrifugiert und durch anschließendes Waschen der Resthemmstoff entfernt. Ein Teil dieser Zellen wurde dann in eisgekühlte, zunächst hemmstofffreie Nährlösung übertragen. Die Impfmenge war bei den einzelnen Versuchen unterschiedlich und so bemessen, daß eine Trübung entstand, die derjenigen der Ausgangskultur zu Versuchsbeginn entsprach. Auf diese Weise konnte die Bakterienzahl in gewissen Grenzen konstant gehalten werden. Der Hemmstoffzusatz erfolgte auch hier $\frac{1}{2}$ Std nach Versuchsbeginn.

Nur kurz soll darauf hingewiesen werden, daß die Möglichkeit einer Hemmstoffinaktivierung durch entsprechende Versuche ausgeschlossen werden konnte (Test der Sterilfiltrate bewachsener Kulturen). In den

nun folgenden Abbildungen sind einige der Ergebnisse der Resistenzversuche dargestellt.

Als Hemmstoff wurde zunächst Sublimat gewählt, bei dessen Einwirkung auf die verschiedenen Bakterien alle beschriebenen Kurventypen auftreten. Die unter dem Einfluß dieses Hemmstoffes gewachsenen Zellen von *Bact. lactis aerogenes* zeigen nach der Übertragung in hemm-

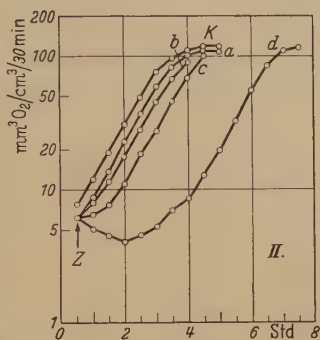
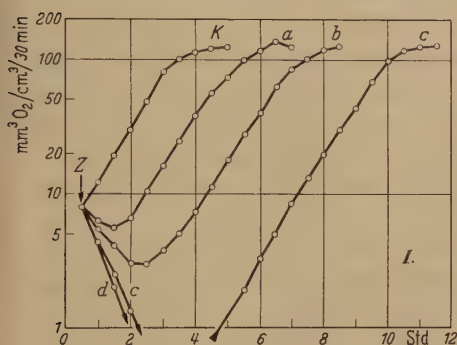


Abb. 11. *Bact. lactis aerogenes*,
Anpassung an Sublimat.

Teilbild I: Ausgangskultur.

Teilbild II: Abimpfung von I a.

Teilbild III: Abimpfung von I c.

Kurve a $0,8 \gamma/\text{cm}^3$,

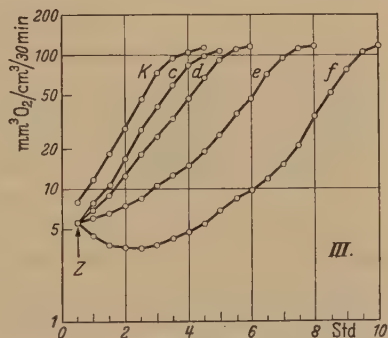
Kurve b $0,6 \gamma/\text{cm}^3$,

Kurve c $1,2 \gamma/\text{cm}^3$,

Kurve d $2,4 \gamma/\text{cm}^3$,

Kurve e $4,8 \gamma/\text{cm}^3$,

Kurve f $10 \gamma/\text{cm}^3$



stofffreie Nährlösung Atmungsgrößen, die einer unbeeinflussten Kultur gleichkommen. Wichtig ist der Befund, daß eine Sublimatkonzentration, bei der diese Zellen herangewachsen sind, überhaupt keinen Einfluß auf den Verlauf der Atmungskurven hat (Abb. 11). Jedoch tritt bei nur geringer Konzentrationserhöhung sofort ein Einfluß auf die Atmungsgrößen ein. Erwähnenswert ist ferner die mit steigender Resistenz abnehmende Heterogenität der Populationen, Beobachtungen, die oben bereits erwähnt wurden.

Staph. aureus mit geringerer Heterogenität als *Bact. lactis aerogenes* zeigt nach der Übertragung in sublimatfreie Nährlösung ebenfalls eine weitgehende Übereinstimmung der Atmungsgrößen mit einer unbeeinflussten Parallelkultur. Bei Einwirkung einer Hemmstoffkonzentration auf die unter der gleichen Konzentration herangewachsenen Zellen ist

im Vergleich zur Ausgangskultur eine deutliche Resistenzzunahme zu beobachten; sie drückt sich im fehlenden Abfall und schnelleren Anstieg der betreffenden Atmungskurve aus. Auch hier zeigen sich wiederum enge Beziehungen zwischen Resistenz und Hemmstoffkonzentration, in allen Fällen reagieren die resistenten Populationen deutlich auf geringe Hemmstoffkonzentrationserhöhungen. Werden mehrere Passagen auf gleichbleibender Sublimatkonzentration durchgeführt, dann sind die Atmungskurven bald denjenigen normaler Kulturen gleich (Abb. 12).

Bei dem gegenüber Sublimat homogenen *Proteus vulgaris* konnte auch nach mehrmaligen Passagen auf verschiedenen Hemmstoffkonzentra-

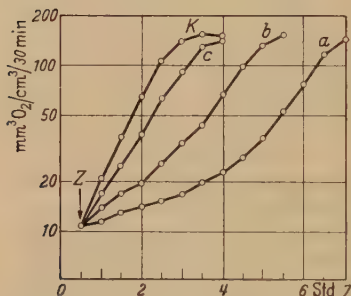


Abb. 12. *Staph. aureus*, Anpassung an Sublimat. Kurve *a* Ausgangskultur bei 1 γ/cm^3 , Kurve *b* Abimpfung von *a*, Kurve *c* Abimpfung von *b*, (*b* und *c* bei gleicher Konzentration wie *a*)

tionen keine Resistenzsteigerung erzielt werden. Die Beeinflussung durch den Hemmstoff entsprach nach der 5. Passage völlig der Ausgangskultur.

Demgegenüber konnte bei *Bact. coli* mit schwacher Heterogenität gegenüber Sublimat eine deutliche, wenn auch geringe Anpassung festgestellt werden. Führt man mehrere Passagen auf gleicher Sublimatkonzentration durch, so erkennt man, daß eine wirkliche Resistenzsteigerung nur bei Anwendung niedriger Konzentrationen eintritt. Die erreichte Resistenz ist wiederum von der angewandten Hemmstoffkonzentration abhängig.

In 6 Fällen wurde zu den Resistenzversuchen zur Nachprüfung der Ergebnisse von je einer einzelnen Zelle ausgegangen. Es ergab sich eine vollkommene Übereinstimmung mit den Stammkulturen, auch hinsichtlich der Empfindlichkeitsverteilung. EAGLE u. Mitarb. (1952) machten die gleiche Feststellung.

An diesen wenigen Beispielen tritt deutlich der erwartete Zusammenhang zwischen Resistenzsteigerung und Heterogenität der Bakterienpopulationen hervor. Durch die Umständlichkeit der Methodik bedingt, wurden einige weitere Versuche in abgeänderter Form vorgenommen: Die Bakterien wurden auf Schrägröhrchen mit verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen über mehrere Passagen hinweg kultiviert. Nach bestimmter Zeit stellte sich dann, wenn überhaupt, ein in einer unbeeinflussten Kultur entsprechendes Wachstum ein, was als äußeres Zeichen einer Resistenzbildung gewertet wurde. Von diesen, bei verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen herangezogenen Kulturen wurden entsprechend den Ausführungen auf S. 12 die Empfindlichkeitsverteilung innerhalb dieser Populationen bestimmt und Teilergebnisse in Abb. 13 und 14 sowie Tab. 7 zusammengestellt. Hier soll noch betont

werden, daß die Variationsbreiten der Ausgangskulturen von den in Tab. 6 angegebenen Werten zum Teil abweichen. Diese Unterschiede können auf die verschiedenartige Anzucht des Testmaterials zurückgeführt werden (Agar- bzw. Flüssigkeitskulturen).

Homogene Kulturen ließen auch hier keine Resistenzsteigerung erkennen. Dementsprechend zeigten die Kulturen auch nach häufigen Passagen gegenüber der ersten Passage kein besseres Wachstum. Eindeutig geht das Fehlen einer Resistenzbildung aus den Werten der Empfindlichkeitsverteilung hervor; denn diese Verteilung entspricht auch nach wiederholten Passagen weitgehend derjenigen der Ausgangskultur.

An schwach heterogenen Populationen konnte nur bei Anwendung relativ niedriger Hemmstoffkonzentrationen und vieler aufeinanderfolgender Passagen eine Resistenzsteigerung erzielt werden, wie dies in den Überlebenden-Kurven zum Ausdruck kommt. Durch weitere Passagen dieser nur schwach resistenten Stämme auf geringfügig erhöhten Konzentrationen konnten diese auch an solche angepaßt werden, bei denen der Ausgangsstamm kein Wachstum mehr zeigte (Abb. 13, links).

Wurden die schwach heterogenen Ausgangsstämme jedoch gleich auf höhere Konzentrationen übertragen, dann wurde die maximale Resistenz des Ausgangsstammes nicht überschritten. Eine mehr oder weniger starke Anpassung konnte hier nur sehr langsam, nach etwa 10–20 Passagen beobachtet werden. Nach Abb. 13 (rechts) haben sich die resistentesten Zellen der Ausgangskultur im Laufe der 16 Passagen angereichert und so eine fast homogene Kultur gebildet. Daß es sich dabei nicht um Mutanten handeln kann, geht daraus hervor, daß Populationen (ohne Hemmstoff gewachsen) aus Einzell-Kulturen, die von den wenigen, im allgemeinen sehr kleinen Kolonien aus dem oberen Bereich der Grenzkonzentration hergestellt wurden, eine dem Ausgangsstamm entsprechende Empfindlichkeitsverteilung besitzen. Die Zahl der resistentesten Zellen ist gegenüber der Ausgangskultur unverändert geblieben, obwohl die Bakterienzelle, aus der die Population hervorging, etwa die maximale Resistenz der Ausgangskultur besaß.

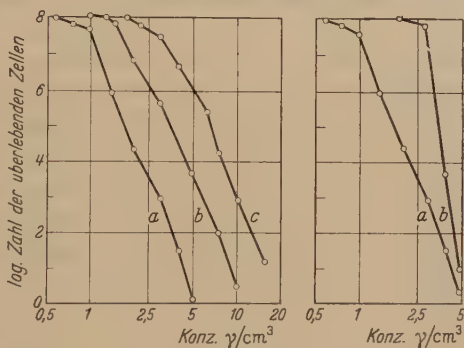


Abb. 13. *Proteus vulgaris*, Anpassung an Terramycin. Links: a Ausgangskultur; b Ausgangskultur nach 5 Passagen auf 1,5 γ/cm^3 ; c an 1,5 γ/cm^3 angepasste Kultur (b) nach 5 Passagen auf 2,0 γ/cm^3 . Rechts: a Ausgangskultur; b Ausgangskultur nach 16 Passagen auf 4,0 γ/cm^3

Bei heterogenen und stark heterogenen Kulturen läßt sich eine Resistenz allgemein leicht, auch bei Anwendung höherer Konzentrationen, erreichen. Die Verteilungskurven der resistenten Stämme verlaufen praktisch derjenigen der Ausgangskultur parallel, die minimalhemmende Grenzkonzentration kommt stets der Konzentration nahe, bei der die einzelnen Stämme herangezogen wurden. Natürlich zeigt sich auch hier häufig, daß die Kulturen allmählich homogener werden, somit den maximalen Resistenzgrad erreicht haben (Abb. 14).

Einige weitere Ergebnisse über die Beziehung zwischen Resistenzgrad und angewandter Hemmstoffkonzentration können der Tab. 7 ent-

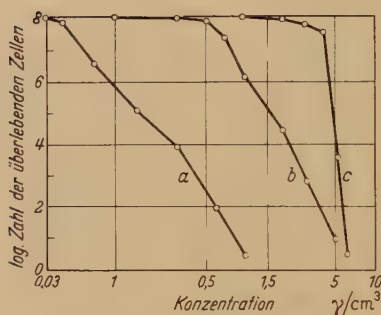


Abb. 14. *Bact. prodigiosum*, Anpassung an Aureomycin. *a* Ausgangskultur; *b* Ausgangskultur nach 2 Passagen auf 0,5 g/cm³; *c* Kultur *b* nach 7 Passagen auf 5,0 g/cm³

nommen werden. In den senkrechten Spalten ist dort die Konzentration der Hemmstoffe angegeben, bei denen die Bakterien über mehrere Passagen hinweg herangezogen wurden. Die Angaben der waagerechten Spalten entsprechen den im Verteilungstest angewandten Hemmstoffkonzentrationen.

In die dazugehörigen Felder sind die im Test gefundenen Kolonienzahlen in Prozenten, bezogen auf Kontrollplatten ohne Hemmstoff, angegeben. Die unterstrichenen Zahlen stellen die Werte dar, die bei der

Untersuchung der resistenten Stämme gegen ihre Kultivierungskonzentration erhalten wurden. So ist leicht erkennbar, daß dadurch allgemein keine Beeinflussung festzustellen ist, daß aber bei der nächst höheren Testkonzentration ein bestimmter Teil der Population vermehrungsfähig bleibt.

Zusammenfassend läßt sich über die Versuche der Resistenzbildung sagen, daß bei der Anwendung geringer Hemmstoffkonzentrationen über 90% der eingesäten Zellen der angewandten Konzentration gegenüber resistent sein können. Der Grad der ausgebildeten Resistenz entspricht auch bei enger Staffelung der Hemmstoffkonzentrationen derjenigen Konzentration, bei der der Stamm herangezogen wurde. EAGLE u. Mitarb. (1952), die zu entsprechenden Ergebnissen bei Penicillin, Streptomycin und Chloromycetin kamen, betonen, daß diese Ergebnisse nicht auf schrittweisen und diskontinuierlichen Unterschieden in der Resistenz der Bakterien beruhen können, wie es die Annahme von Spontanmutationen verlangt, es sei denn, daß die schrittweise Änderung zu gering ist, um mit den angewandten Methoden festgestellt zu werden. Nach den bisherigen Erfahrungen kann aber nicht erwartet werden, daß bis

über 90% der Zellen einer Bakterienkultur, auch bei Einzell-Iso-
lierungen, aus resistenten Mutanten bestehen. Dies würde eine un-
wahrscheinlich hohe Mutationsrate fordern.

Tabelle 7. *Bact. coli*, Zusammenhang zwischen Hemmstoffresistenz
und Kultivierungskonzentration
(Erklärung im Text)

HgCl ₂ γ/cm ³	0	10	15	18	25	30	40	50	100 γ/cm ³
0	<u>100</u>	40	1,5	—	0,008	—	—	—	—
15			<u>100</u>	39	4	—	0,035	0,003	0
20			<u>100</u>	—	70	—	2	0,07	0,0003
25					<u>100</u>	43	9	—	0,001

Rivanol γ/cm ³	0	12	15	24	28	48	60	100	125	200 γ/cm ³
0	<u>100</u>	12	—	1,3	—	0,08	—	0,0034	—	0,006
12		<u>100</u>	85	24	—	2,5	—	0,1	—	0,006
24				<u>100</u>	79	23	—	1,5	—	0,1
48						<u>98</u>	64	26	—	2,1
100								<u>100</u>	78	24

Acridin- orange γ/cm ³	0	10	15	20	25	40	50	80	100	150 γ/cm ³
0	<u>100</u>	65	—	27	—	0,015	—	0,01	—	0
10		<u>100</u>	33	16	—	0,9	—	0,036	—	0,001
20				<u>100</u>	53	11	—	0,8	—	0,035
40						<u>100</u>	62	10	—	0,7
80								<u>100</u>	57	19

Sulfa- thiazol γ/cm ³	0	7	8	10	15	18	30	35	50 γ/cm ³
0	<u>100</u>	65	—	25	2	—	0,009	—	0,0002
7		<u>100</u>	80	40	—	—	0,06	—	0,001
15					<u>100</u>	82	10,5	—	0,18
30							<u>100</u>	55	0,008

Deutliche Beziehungen bestehen zwischen Variationsbreite und Resistenzbildung der Populationen: Während bei homogenen Stämmen auch nach vielen Passagen auf hemmstoffhaltigen Kulturmedien keine Resistenzsteigerung zu erreichen war, konnte bei heterogenen Populationen eine solche allgemein erzielt werden. Dabei zeigte sich, daß die Schnelligkeit der Resistenzbildung sehr unterschiedlich sein kann. Bei stark heterogenen Kulturen war die Resistenz gegenüber einer bestimmten Hemmstoffkonzentration schon nach einer Passage erreicht, mit fallender Variationsbreite war eine steigende Anzahl von Passagen notwendig, um eine vollständige Anpassung zu erzielen.

In wenigen Arbeiten wird diese langsame Anpassung durch eine allmähliche Adaptation mit stetig sich verkürzender lag-Phase erklärt. Dagegen lassen die eigenen Untersuchungen vermuten, daß eine langsame Anpassung durch die mehr oder weniger schnelle Ausschaltung des gehemmten Teils der Bakterienpopulation zustande kommt. Diese Vermutungen werden einmal durch die Tatsache gestützt, daß mit fallender Heterogenität der Anteil der durch eine bestimmte Hemmstoffkonzentration gehemmten Zellen rasch zunimmt (S. 24), die völlig ungehemmten Zellen aber weniger werden. Je geringer so die Variationsbreite wird, desto mehr Zellen, die bei der Einwirkung nur schwach gehemmt wurden, werden bei der folgenden Übertragung auf die neue Passage überführt. Das Verhältnis der gehemmten zu den ungehemmten Zellen ändert sich deshalb nur langsam.

Aus den Ausführungen folgt weiter, daß eine Resistenzbildung nur von den ungehemmten Zellen der Population ausgeht. Bei schwach heterogenen Kulturen zeigte sich ja, daß eine deutliche Resistenzsteigerung nur bei Anwendung relativ geringer Hemmstoffkonzentrationen möglich war, während bei höheren Konzentrationen nur eine langsame Anreicherung der resistentesten Zellen eintrat. Zieht man in diese Betrachtungen die Atmungskurven der schwach heterogenen Kulturen mit ein, bei denen nur bei relativ niederen Konzentrationen der Hemmstoffe der unbeeinflussten Kontrolle entsprechende Atmungsmaxima erreicht wurden, so läßt sich annehmen, daß nur dann das Maximum der Kontrolle erreicht wird, wenn völlig unbeeinflusste Zellen in der Kultur vorhanden sind.

Zur Resistenzzielung gegenüber bestimmten Hemmstoffkonzentrationen sind nur solche Zellen befähigt, die auf Grund der Variationsbreite der Populationen von den angewandten Hemmstoffkonzentrationen unbeeinflusst bleiben. Für die Resistenzentstehung wäre somit eine Selektion der resistenten Modifikanten mit anschließender Adaptation, also Bildung von Dauermodifikanten, verantwortlich zu machen. Dauermodifikationen als Ursache einer Hemmstoffresistenz bei Mikroorganismen hat JOLLOS (1921) für Paramäcien angegeben; die Beweiskraft der Versuche wird allerdings bezweifelt, sie sind aber noch nicht widerlegt.

Zum Abschluß dieser Betrachtungen sollen hier noch einige Bemerkungen über die Stabilität angepaßter Stämme angefügt werden. Zunächst sei betont, daß nach neueren Angaben (ABRAHAM 1953) eine erworbene Resistenz selten, wenn überhaupt, irreversibel ist. Lediglich die Schnelligkeit, mit der diese Rückwandlung eintritt, ist sehr variabel und scheint neben der Art des Organismus von den Eigenschaften des Hemmstoffes und vom Grad der erreichten Resistenz abzuhängen.

Verschiedene Autoren (SCHMIDT u. Mitarb., 1942; DAVIES u. Mitarb., 1945) berichten, daß eine Resistenz gegenüber einem Hemmstoff nach

nur wenigen Passagen auf hemmstoffhaltigem Medium schnell verloren gehen kann, während nach weiteren Passagen die Anpassung wesentlich stabiler ist. Es ist möglich, daß Unterschiede dadurch zustande kommen, daß nach wenigen Passagen in der Population neben den angepaßten Zellen noch ein mehr oder weniger großer Teil gehemmter Zellen vorhanden ist, die somit keine Dauermodifikationen darstellen und bei Übertragung auf hemmstofffreies Nährmedium eine Nachkommenschaft ursprünglicher Empfindlichkeitsverteilung hervorbringen. Als Folge tritt eine Abnahme der Resistenz ein. Nach einer Vielzahl von Passagen dagegen können diese einfachen Modifikanten durch die fortlaufende Hemmung, der sie unterliegen, aus der Kultur verschwunden sein. Die Resistenz wird dann von den Dauermodifikanten bestimmt.

Auch die Beobachtungen von VOSS (1952) und PENFOLD (1910) können hier angeführt werden. Diese Autoren berichten, daß eine Resistenz um so länger beibehalten wird, je leichter sie zu erzeugen war. Auch diese Erscheinung läßt sich mit der Heterogenität der Bakterien in Zusammenhang bringen. Denn bei sehr schwieriger Anpassung reichern sich nach eigenen Versuchen nur Modifikanten an, die natürlich nach der Übertragung auf normales Kulturmedium sehr rasch die ursprüngliche Empfindlichkeitsverteilung zurückerlangen und somit einer dem Ausgangsstamm entsprechenden Wachstumshemmung unterliegen. Auf der anderen Seite war bei stark heterogenen Kulturen schon nach einmaliger Passage eine vollständige Resistenz gegenüber der entsprechenden Hemmstoffkonzentration erreicht worden. Die Möglichkeit einer Übertragung nicht adaptierter Zellen ist durch deren Minderzahl unwahrscheinlich geworden. Die Resistenzstabilität beruht so ausschließlich auf den Dauermodifikanten.

Die Wirkung der Einsaatmenge auf die Aktivität bakterienhemmender Substanzen

Nach den Ergebnissen über die Heterogenität der Bakterienkulturen gegenüber Hemmstoffen entstand die Frage, wieweit die oft beschriebene unterschiedliche Wirkung von Hemmstoffen bei verschiedenen großen Einsaatmengen dieser Heterogenität zugeschrieben werden kann.

Über das Problem der Einsaatmenge und Hemmwirkung liegen eine große Anzahl sich widersprechender Untersuchungen vor. So konnten z. B. ABRAHAM u. Mitarb. (1941), FISHER (1943) und McKEE u. Mitarb. (1944) bei der Einwirkung von Penicillin auf Staphylokokken kaum einen Einfluß der Einsaatmenge auf die Wirkung einer bestimmten Penicillinkonzentration feststellen. Demgegenüber stehen Angaben von RANTZ u. KIRBY (1944) sowie SPINK u. FERRIS (1947), wonach deutliche Beziehungen zwischen Einsaatmenge und Penicillinwirkung bestehen. Unterschiedliche Ergebnisse liegen auch bei anderen Antibiotica vor.

PARKER (1946) fand bei der Wirkung der Einsaatmenge auf die Penicillinempfindlichkeit von 163 Staphylokokkenstämmen, daß sich die einzelnen Stämme hinsichtlich der Einsaatwirkung unterschiedlich verhielten. Während sehr empfindliche

Stämme bei unterschiedlichen Einsaaten in gleichem Maße gehemmt wurden, konnte bei resistenteren Stämmen eine Herabsetzung der Penicillinwirkung bei vergrößerter Einsaat festgestellt werden. LURIA (1946) sowie GILSON u. PARKER (1948) schließen aus ähnlichen Beobachtungen, daß der Einsateffekt bei Staphylokokken, die keine Penicillinase bilden, von dem Vorhandensein unterschiedlich resistenter Bakterien abhängt. Während bei kleinen Einsaaten nur wenige oder keine resistenten Zellen vorhanden sind, kann die Zahl bei größeren Einsaaten bedeutend höher sein. Dies resultiert in einem frühzeitigeren oder besseren Wachstum. In diesem Zusammenhang sei noch einmal an die unterschiedliche Heterogenität der isolierten *Bact. coli*-Stämme erinnert (S. 25).

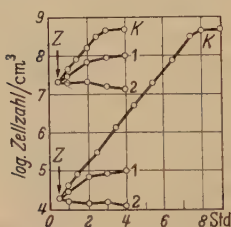


Abb. 15. *Bact. coli*, Einwirkung von Phenol auf verschiedene Einsaatmengen. Kurve 1 1,25 mg/cm³, Kurve 2 2,0 mg/cm³

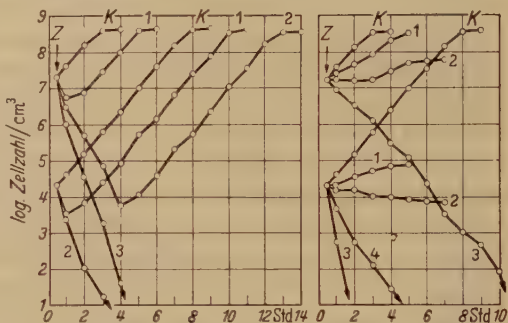


Abb. 16. *Bact. coli*, Einwirkung von Rivanol (links) und Patulin (rechts) auf verschiedene Einsaatmengen. Bei Rivanol: Kurve 1 60 γ/cm³, Kurve 2 200 γ/cm³, Kurve 3 300 γ/cm³. Bei Patulin: Kurve 1 25 γ/cm³, Kurve 2 30 γ/cm³, Kurve 3 50 γ/cm³

Um mit den vorangehenden Ergebnissen vergleichbare Werte zu erlangen, mußte natürlich angestrebt werden, auch bei diesen Untersuchungen die Warburg-Methode anzuwenden. Nach einigen Vorversuchen stellte sich jedoch heraus, daß eine Einsaatdifferenz von einer Zehnerpotenz nur in wenigen Fällen deutliche Effekte hervorbrachte. Da bei Einsaatmengen unter 10^7 Zellen je ccm die Atmungsgrößen bestenfalls im unteren Bereich der meßbaren Werte liegen, eine teilweise Abtötung der Populationen demnach nicht kontrolliert werden konnte, wurden in den diesbezüglichen Untersuchungen nicht die Atmungsgrößen, sondern die dazugehörigen Lebendzellzahlen ermittelt. In Abständen von 1 Std wurde je ein Reaktionsgefäß dem Thermostatenbad entnommen und mit Hilfe der Plattenmethode die jeweilige Zahl der lebenden Zellen bestimmt. Die Einsaatmengen betrugen 10^7 bzw. 10^4 Zellen je ccm, die Hemmstoffe wurden entsprechend den Atmungsversuchen $\frac{1}{2}$ Std nach Versuchsbeginn den wachsenden Kulturen zugegeben.

Abb. 15 zeigt die Lebendzellzahlen unter der Einwirkung verschiedener Phenolkonzentrationen. Die Vermehrungsgeschwindigkeit der Bakterien wird bei hoher und niederer Einsaat bei den sich entsprechenden Konzentrationen in gleichem Maße herabgesetzt. Außerdem ist eine Übereinstimmung in der Beendigung des logarithmischen Wachstums festzustellen. Die Aktivität des Phenols ist demnach unabhängig von der Größe der Einsaat des gegenüber diesem Hemmstoff homogenen *Bact. coli*-Stammes.

Ein anderes Bild ergibt sich bei der Einwirkung von Rivanol auf den gleichen Stamm, der jedoch gegen diesen Hemmstoff eine sehr starke Heterogenität aufweist. Die Einwirkung niederer und mittlerer Konzentrationen ergibt bei beiden Einsaatmengen etwa gleichverlaufende Kurvenbilder (Abb. 16 links). Der Abfall der Keimzahlen und der plötzliche Wiederanstieg decken sich weitgehend. Bei höheren Konzentrationen sinkt die Keimzahl der niederen Einsaat rasch auf 0 ab, während bei höherer Einsaatmenge die Zellzahlen nach anfänglichem Abfall parallel der unbeeinflussten Kontrolle ansteigen. Auffällig ist der Unterschied der Konzentrationen, die gerade eine vollständige Abtötung der Population hervorrufen. Während diese Grenzkonzentration bei hoher Einsaat zwischen 200 und 300 γ/cm^3 liegt, wird die niedere Einsaatmenge schon von 120 γ/cm^3 vollständig abgetötet. Eine Veränderung der Hemmstoffkonzentration in Gegenwart der Zellen, z. B. durch Absorption, und damit verbundene Unterschiede bei hohen und niederen Einsaaten kann ausgeschlossen werden.

Die Zusammenstellung *Bact. coli* — Patulin, mit geringen Empfindlichkeitsunterschieden in der Population, ergaben Werte, die in Abb. 16 rechts dargestellt sind. Auch hier fallen wieder die unterschiedlichen Werte der Grenzkonzentrationen auf.

Tabelle 8. Wirkung der Einsaatmenge

Bakterien	Hemmstoff	Typ nach Tab. 3	Einsaateffekt Hemmstoffkonz.		
			nieder	mittel	stark
<i>Bact. coli</i>	Phenol	I	—	—	—
<i>Bact. coli</i>	Rivanol	I	—	—	—
<i>Bact. coli</i>	Terramycin	I	—	—	—
<i>Proteus vulgaris</i> .	Sublimat	I	—	—	—
<i>B. prodigiosum</i> . .	Chloromycetin	I	—	—	—
<i>St. aureus</i>	Terramycin	II	±	+	+
<i>St. aureus</i>	8-Oxychinolin	II	—	+	+
<i>Bact. coli</i>	Sublimat	II	±	+	+
<i>Bact. coli</i>	Patulin	II	+	+	+
<i>Bact. coli</i>	Rivanol	II	+	+	+
<i>Proteus vulgaris</i> .	Rivanol	III	+	+	+
<i>Bact. coli</i>	Acridinorange	III	+	+	+
<i>Bact. coli</i>	Rivanol	IV	—	—	+
<i>St. aureus</i>	Patulin	IV	—	—	+
<i>B. prodigiosum</i> . .	Terramycin	IV	—	—	+

Aufschlußreich war der Versuch, die Einsaatwirkung an gegenüber verschiedenen Rivanolkonzentrationen resistenten Bakterienstämmen zu verfolgen. Während der Ausgangsstamm einen deutlichen Einfluß der Einsaatmenge auf die antibakterielle Wirkung des Rivanols erkennen ließ, nahm diese Beeinflussung mit zunehmender Resistenz ab und wurde

schließlich unbedeutend. Mit steigender Resistenz ist bei diesem Bakterienstamm ein Übergang von stark heterogener nach homogener Zusammensetzung zu beobachten.

In Tab. 8 sind die Ergebnisse über die Wirkungsbeeinflussung der Hemmstoffe durch die Größe der Einsaat zusammengestellt.

Die Beeinflussung der Wirkung einer bestimmten Hemmstoffkonzentration steht danach allgemein in engem Zusammenhang mit der Empfindlichkeitsverteilung innerhalb der Bakterienpopulationen. Während bei homogenen Kulturen keinerlei Einfluß der Einsaatmenge beobachtet werden konnte, wird der Wachstumsverlauf heterogener Kulturen je nach Konzentration mehr oder weniger stark beeinflusst. Dieser Einfluß macht sich vor allem durch den verzögerten bzw. fehlenden Anstieg der Keimzahlen bei niedriger Einsaatmenge bemerkbar, außerdem aber durch den Unterschied der Konzentrationen, die zur vollständigen Abtötung der unterschiedlichen Einsaaten benötigt werden.

Diese Unterschiede der Grenzkonzentrationen können aus der Verteilung der Empfindlichkeit der Zellen einer Kultur abgeleitet werden. Das Verhältnis zwischen hoher und niedriger Einsaat betrug in den vorliegenden Versuchen 1 : 1000. In der niedrigeren Einsaatmenge waren demnach als resistenteste Zellen solche zu erwarten, deren Häufigkeit um $\frac{1}{1000}$ der hohen Einsaatmenge betrug.

Zusammenfassung

1. Bei der Einwirkung von Hemmstoffen auf das Bakterienwachstum lassen sich verschiedenartige Hemmungskurven feststellen. Der Verlauf dieser Wachstumskurven kann durch unterschiedliche Stickstoffernährung verändert werden.

2. Die Stickstoffernährung hat einen entscheidenden Einfluß auf die Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber Hemmstoffen. Mit zunehmender Wachstumsgeschwindigkeit, bedingt durch die Güte der Stickstoffquelle, werden für eine minimale Wachstumshemmung steigende Hemmstoffkonzentrationen benötigt.

3. Die in Atmungsversuchen unter Anwendung von 10 Hemmstoffen und 5 Bakterienstämmen erhaltenen Atmungskurven wurden in 4 Gruppen eingeteilt, die durch Übergänge miteinander verbunden sind. Bei allen Bakterienstämmen treten unter der Einwirkung der Hemmstoffe alle 4 Kurventypen auf. Der durch einen bestimmten Hemmstoff hervorgerufene Kurventyp ist bei verschiedenen Bakterien unterschiedlich.

4. Die geprüften Bakterien zeigten gegenüber den einzelnen Hemmstoffen eine mehr oder weniger große Heterogenität in der Empfindlichkeit der Einzelzellen. Diese Heterogenität ist bei ein und demselben Organismus gegenüber verschiedenen Hemmstoffen verschieden. Zwischen Kurventyp und Heterogenität bestehen enge Zusammenhänge.

5. 12 aus Boden und Wasserproben isolierte *Bact. coli*-Stämme zeigten gegenüber ein und demselben Hemmstoff unterschiedliche Heterogenität. Durch fortlaufende Kultur verstärkt sich die ursprüngliche Heterogenität bis zu einem konstanten Maximum.

6. Untersuchungen über die Resistenzbildung gegenüber Hemmstoffen zeigten, daß homogene Stämme auch nach mehrmaligen Passagen auf gleichen Hemmstoffkonzentrationen keine Resistenz ausbildeten. Bei den heterogenen Stämmen nahm die Leichtigkeit zur Resistenzbildung mit steigender Heterogenität zu. Zwischen Hemmstoffresistenz und Anpassungskonzentration bestehen enge Zusammenhänge. An Hand der Versuchsergebnisse wird gezeigt, daß unter den gewählten Bedingungen eine Resistenzbildung adaptiver Natur vorliegt.

7. Die Wirkung der Einsaatmenge der Bakterien auf die Hemmung zeigt einen engen Zusammenhang mit der Heterogenität der betreffenden Kulturen. Die Wirkung einer bestimmten Hemmstoffkonzentration ist bei homogenen Populationen nicht von der Einsaatmenge abhängig. Bei heterogenen Kulturen kann der Einsaateffekt auf die bei verschiedenen Einsaaten unterschiedliche Anzahl der resistentesten Modifikanten zurückgeführt werden.

Herrn Prof. Dr. RIPPEL-BALDES danke ich für Anregungen und Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Ausgeführt mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Literatur

- ABRAHAM, E. P.: Action of Antibiotics on Bacteria, in FLOREY u. Mitarb.: Antibiotics, London 1949; The Development of Drug Resistance in Microorganisms, III. Symp. Soc. Gen. Microbiol., Cambridge 1953. — ABRAHAM, E. P., E. CHAIN, C. M. FLETCHER, H. W. FLOREY, A. D. GARDNER, N. G. HEATLEY and M. A. JENNINGS: Lancet **1941**, 177 II. — BRYSON, V., and M. DEMEREC: Ann. N. Y. Acad. Sci. **53**, 283 (1950). — DAVIES, D. S., C. N. HINSHELWOOD and J. M. PRICE: Trans. Farad. Soc. **40**, 397 (1944); **41**, 163 (1945). — DEMEREC, M.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **31**, 16 (1945); J. Bacter. **56**, 63 (1948); J. Clin. Invest. **28**, 891 (1949). — EAGLE, H., R. FLEISCHMANN and M. LEVY: J. Bacter. **63**, 623 (1952). — ESTOR, W.: Zbl. Bakter. II, **72**, 411 (1927). — FISHER, A. M.: J. Hop. Hosp. Bull. **73**, 343 (1943). — FLOREY, H. W. u. Mitarb.: Antibiotics, London 1949. — FOSTER, J. W.: J. of Biol. Chem. **144**, 285 (1942). — GILSON, B. ST. C., and R. P. PARKER: J. Bacter. **55**, 801 (1948). — GREIG, M. E., and J. C. HOOGHEHEIDE: J. Bacter. **41**, 549 (1941). — HENNEBERG, G.: Einführung in die bakteriologische Untersuchungstechnik zur Penicillintherapie. Fischer, Jena 1947. — HINSHELWOOD, C. N.: Biologic. Rev. **19**, 150 (1944); The Chemical Kinetics of the Bacterial Cell, Oxford 1946. — HIRSCH, J.: Rev. Fac. Scien. Univ. d'Istanbul, Nouv. Serie, Tome I, Fasc. 3, 1936; Comte rendu ann. acad. Soc. Turque de Science Phys. Nat. **12**, 1 (1944/45). — HUGHES, W. H.: J. Gen. Microbiol. **6**, 175 (1952). — JOLLOS, V.: Arch. Protistenkunde **43**, 1 (1921). — LIPSCHITZ, W.: Zbl. Bakter. I **90**, 569 (1923). — LURIA, S. E.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **61**, 46 (1946). — LURIA, S. E., and M. DELBRÜCK: Genetics **28**, 491 (1943). — MANDELSTAM, J., and J. YUDKIN: Biochemic. J. **51**, 686 (1952). — MCKEE, C. M., G. RAKE and A. E. O. MENZEL: J. of Immunol. **48**, 259 (1944). —

PARKER, R. F.: *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* **63**, 443 (1946). — PAUL, TH., u. B. KRÖNIG: zit. nach LAFAR, *Handbuch der Techn. Mykologie*, Jena 1904—1907, Bd. I, Seite 491. — PENFOLD, W. J.: *J. of Path.* **14**, 406 (1910). — RADLER, F.: *Arch. Mikrobiol.* **22**, 335 (1955). — RANTZ, L. A., and W. M. KIRBY: *J. of Immun.* **48**, 333 (1944). — RIPPEL-BALDES, A.: *Zbl. Bakter. I* **154**, 175* (1949). — RIPPEL-BALDES, A.: *Grundriß der Mikrobiologie*, Springer: Berlin 1955. — SCHMIDT, L. H., C. SESLER and H. A. DETTWEILER: *J. Pharmacol. a. Exper. Ther.* **74**, 175 (1942). — SPINK, W. W., and V. FERRIS: *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* **59**, 188 (1945). — STEVENS, L. F.: zit. nach LAFAR, *Handbuch der Techn. Mykologie*, Jena 1904—1907 Bd. I Seite 491. — UMBREIT, W. W., R. H. BURRIS and J. P. STAUFFER: *Manometric Techniques and Related Methods for the Study of Tissue Metabolism*. Minneapolis 1947. — VOSS, E.: *Arch. Mikrobiol.* **18**, 101 (1952). —

(Aus dem Institut für Lebensmitteltechnologie und Verpackung e. V., München*)

Untersuchungen über das Absterben von Hefen und anderen Mikroorganismen in Substraten von hohem NaCl- bzw. Zuckergehalt

Von

M. v. SCHELHORN**

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. März 1956)

Seit Jahrhunderten bedient man sich der Tatsache, daß hohe NaCl- und Zuckerkonzentrationen, bzw. die auf diese Weise erreichten hohen osmotischen Werte Lebensmittel weitgehend vor mikrobiologischem Verderb schützen. Im Rahmen der modernen Hygiene gewinnt ferner die Frage, inwieweit Krankheitserreger auf und in verpackten Lebensmitteln am Leben bleiben oder absterben, steigendes Interesse. Auch dieser Fragenkomplex hängt aufs engste mit den Beziehungen der Lebensfähigkeit bzw. des Absterbens von Mikroorganismen zum osmotischen Wert bzw. zur Gleichgewichtsfeuchtigkeit ihrer Umgebung zusammen. Zahlreiche hier hereinspielende Probleme sind jedoch noch weitgehend ungeklärt. Es wurde daher die Bearbeitung der Beziehungen der Mikroorganismen zum osmotischen Wert bzw. zu der Gleichgewichtsfeuchtigkeit in das Forschungsprogramm unseres Institutes aufgenommen.

Nachdem in früheren Arbeiten nach den Grenzkonzentrationen für die Lebensfähigkeit von Mikroorganismen in zuckerreichen Substraten gesucht wurde (v. SCHELHORN 1950 a, 1950 b) und grundlegende Zusammenhänge zwischen osmotischem Wert und Mikroorganismenwachstum in Zuckerlösungen geprüft wurden (SCHACHINGER u. HEISS 1951), war es das Ziel der im folgenden dargelegten Untersuchungen, den zeitlichen Verlauf des Absterbens von Mikroorganismen unter der Wirkung hoher NaCl- und Zuckerkonzentrationen zu verfolgen und festzustellen, ob dieses Absterben von Mikroorganismen in NaCl- und zuckerreichen Substraten durch hohe und tiefe Temperaturen beschleunigt oder verzögert wird.

* Direktor und Forschungsleiter Dr. Ing. habil. R. HEISS.

** Als technische Assistentin wirkte Frau G. PRÄG bei der Durchführung der zahlreichen Versuche mit.

Methodik

Der weitaus größte Teil der Versuche wurde mit *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN durchgeführt. Die Bierhefe besitzt in ihrer vegetativen Form mittlere Widerstandsfähigkeit gegenüber hohen NaCl- und Zuckerkonzentrationen. Daher wurden mit Hilfe dieser Art gewisse allgemeine Fragen einer näheren Betrachtung unterzogen. Es wurde eine Einzell-Kultur verwendet. Die Hefe wurde auf Malz-agar vom pH-Wert 4,5 kultiviert. Zu den Versuchen wurden jeweils Kulturen verwendet, die nach der Beimpfung 4 Tage bei 20° C gewachsen waren. Soweit Versuche bei Temperaturen, die von 20° C abwichen, jedoch an sich nicht letal wirkten, durchgeführt wurden, wurden die Kulturen bereits vor Versuchsbeginn 12 Std der betreffenden Temperatur ausgesetzt. Kulturen, die zu Versuchen bei letalen Temperaturen (im Versuch ab 40° C) bestimmt waren, wurden vor Versuchsbeginn 12 Std auf 34° C gebracht.

Ergänzend wurden einige Versuche mit widerstandsfähigeren Arten (*Bacillus* sp., *Aspergillus niger* van Tieghem, *Hansenula anomala* Hansen, Sydow) und mit *Staphylococcus aureus* Rosenbach als Vertreter weniger gegen hohe NaCl- und Zuckerkonzentrationen widerstandsfähiger Mikroben durchgeführt.

Wesentlich war die Wahl des geeigneten Zuckers. Dextrose und Saccharose waren nicht brauchbar, da infolge der schlechten Löslichkeit keine genügend hohen Konzentrationen erreicht werden konnten. Invertzucker hätte zwar hinsichtlich der Löslichkeit den Ansprüchen genügt, besonders, da die Auskristallisation der Dextrose aus übersättigten Invertzuckerlösungen nur langsam vonstatten geht. Invertzucker konnte aber nicht verwendet werden, da es sich um keinen einheitlichen Körper handelt. So fiel die Wahl auf Fructose, auf deren Bedeutung für die Klärung der für Mikroorganismen in hochkonzentrierten Zuckerlösungen herrschenden Bedingungen bereits früher hingewiesen wurde (v. SCHELHORN 1950a, 1950b). Es wurde „d-Laevulose, rein für bakteriologische Zwecke“ der Firma Bayer verwendet.

Die Verwendung von Fructose zu Nährlösungen bereitet insofern Schwierigkeiten, als sich, wie schon BAUMGARTNER anführt, bei Erhitzung hochkonzentrierter Lösungen bis zum Siedepunkt des Wassers offenbar Caramellisationsprodukte bilden, die auf Mikroorganismen schädigend wirken. Die Ergebnisse früherer Versuche (v. SCHELHORN 1954), bei denen die verwendeten hochkonzentrierten Fructoselösungen einer Hitzesterilisation unterworfen wurden, brachten Ergebnisse, die von denen erneuter Versuche etwas abwichen. Dieser Widerspruch muß durch die Wirkung solcher Caramellisationserscheinungen in den vor der eigentlichen Versuchsdurchführung im Dampftopf sterilisierten hochkonzentrierten Fructoselösungen erklärt werden. Bei den älteren Sterilisierungsversuchen mit *Sacch. cerevisiae* in hochkonzentrierten Fructoselösungen (v. SCHELHORN 1954) sah es nämlich so aus, als ob bei Fructosekonzentrationen von etwa 50%¹ aufwärts ein Absinken der Überlebensquoten unter die in zuckerfreien Lösungen gefundenen Werte eintrete. Als darauf verzichtet wurde, die hochkonzentrierten Fructoselösungen vor der Impfung im Dampftopf zu sterilisieren, ergaben sich die Werte, über die im folgenden berichtet werden soll.

Unter Verzicht auf Hitzesterilisation der hochkonzentrierten Fructoselösungen wurde die annähernde Keimfreimachung auf folgende Weise angestrebt: Es wurden zunächst Lösungen mit 75% Fructosegehalt hergestellt und diese einige Tage bei 30° C aufbewahrt. Die Mehrzahl der etwa vorhandenen fremden Mikroorganismen starben in der hochkonzentrierten Zuckerlösung während dieser Zeit ab. Etwa über-

¹ Alle Prozentangaben beziehen sich auf den zu 100 Teilen ergänzten Wassergehalt, also auf 100 g Lösung.

lebende, besonders widerstandsfähige Formen mußten in Kauf genommen werden, konnten sich aber, da ihre Zahl im Vergleich zu den eingepfropften Zellen nur gering war, während der kurzen Behandlungszeit, die die Sterilisierungsversuche erforderten, nicht vermehren und daher deren Ergebnis nicht wesentlich beeinflussen, um so weniger, als Bakterien in den mit Agar von p_H 4,5 durchgeführten Sekundärkulturen sich im allgemeinen nicht oder nur langsam vermehren. Anders liegen die Verhältnisse bei Lagerversuchen, die sich über längere Zeiträume erstreckten. Hier konnten natürlich keine mikrobiellen Verunreinigungen in Kauf genommen werden. Bei solchen Versuchen mußten wir uns daher mit den Ergebnissen, die mit Hilfe hitzesterilisierter Zuckerlösungen gewonnen wurden, begnügen, und so mag in solchen Fällen die Widerstandsfähigkeit der Testorganismen gegenüber den hochkonzentrierten Zuckerlösungen unter dem schädigenden Einfluß von Caramellisationsprodukten etwas niedriger ermittelt worden sein als sie in Wirklichkeit ist. Soweit zu den Sterilisierungsversuchen Zuckerlösungen niedrigerer Konzentration als 75% erforderlich waren, wurden nach einigen Tagen Lagerung der 75%igen Lösung aus dieser unter Beimischung von vorsterilisierter zuckerfreier Nährlösung — unter Vermeidung von Neuinfektionen — die gewünschten Zuckerkonzentrationen hergestellt.

Die Zusammensetzung der Lösungen, denen diese Zucker- und NaCl-Konzentrationen zugesetzt wurden, wechselte je nach den Bedürfnissen der Testmikroorganismen und der Art des Versuches.

Die Versuche mit *Sacch. cerevisiae* und *Hansenula anomala* wurden in Lösungen vom p_H -Wert 4,5 durchgeführt, die Versuche mit Schimmelpilzen und Bakterien in Lösungen vom p_H -Wert 7. Zu den Sterilisierungsversuchen wurde Pufferlösung verwendet, die bei *Sacch. cerevisiae* und *Hansenula anomala* die Zusammensetzung 5,73 g Citronensäure + 8,09 g sekundäres Natriumphosphat/l Wasser, bei Bakterien und Schimmelpilzen die Zusammensetzung 1,185 g NaOH + 6,809 g KH_2PO_4 /l Wasser hatte. Bei Lagerversuchen, die sich über längere Zeiträume erstreckten, mußten den Mikroorganismen Nährstoffe dargeboten werden, damit das Absterben nicht aus Nahrungsmangel erfolgen und so ein neuer unkontrollierbarer Faktor einbezogen werden konnte. Es wurde in denjenigen Versuchsreihen, in welchen die Wirkung wechselnder Zuckerzusätze auf Hefen und Schimmelpilze geprüft werden sollte, eine synthetische Nährlösung der Zusammensetzung 1 g KH_2PO_4 , 2 g KNO_3 , 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,5 g KCl, 0,01 g $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ /l Wasser verwendet. Lagerversuche mit Hefen und Schimmelpilzen mit verschiedenen hohen Zusätzen an NaCl wurden in Malznährbrühe (100 g Malzextrakt/l H_2O) angesetzt. Auf die Zugabe von Puffern wurde bei den Lagerversuchen mit Hefen und Schimmelpilzen verzichtet. Es handelte sich dabei ja um Versuche mit letalen NaCl- bzw. Zuckerkonzentrationen, bei welchen keine Vermehrung der Mikroorganismen mehr eintrat, so daß größere Veränderungen des p_H -Wertes durch die Lebenstätigkeit der Mikroorganismen nicht zu befürchten waren. Geringfügige Schwankungen des p_H -Wertes im Bereich der optimalen p_H -Werte wirken sich, wie Vorversuche ergaben, auf die Lebenstätigkeit von Hefen und von *Aspergillus niger* im allgemeinen und deren Widerstandsfähigkeit gegen hohe Zuckerkonzentrationen im besonderen nicht wesentlich aus. Auf der anderen Seite beeinflußt die Zugabe größerer Puffermengen den osmotischen Wert der Lösung, so daß auch diese Maßnahme für die vorliegenden Untersuchungen einen gewissen Ungenauigkeitsfaktor darstellen würde. Im Gegensatz zu den Lagerversuchen mußten zu den Sterilisierungsversuchen auch Lösungen von geringem osmotischen Wert herangezogen werden. In diesen stellten sich, soweit Zucker vorhanden war, schon innerhalb kurzer Zeiten infolge der Lebenstätigkeit der Mikroorganismen stärkere Änderungen des p_H -Wertes ein. Diese konnten gerade bei Sterilisierungsversuchen das Ergebnis erheblich verfälschen und mußten daher ausgeschaltet werden.

Die Lagerversuche mit *Staphylococcus aureus* und *Bacillus* sp. wurden in oben genannter Phosphatpufferlösung von p_H 7, der je Liter noch 5 g Pepton und 3 g Liebig's Fleischextrakt sowie, wenn nicht die Versuchsanordnung mehr Zucker erforderte, 10 g Dextrose zugesetzt waren, durchgeführt. Auf Grund der stärkeren Empfindlichkeit der Bakterien gegen tiefere p_H -Werte wurde hier die Zugabe von Puffern als unerläßlich erachtet.

Die p_H -Werte wurden jeweils nach Zugabe von Zucker und NaCl sowie nach erfolgter Sterilisierung und Abkühlung nachkontrolliert und, soweit erforderlich, durch erneute Zugabe von NaOH bzw. Citronensäure korrigiert. Auf diese Weise sollte die Fehlerquelle (ANDESSON u. Mitarb. 1949) ausgeschaltet werden, daß bei Zugabe von NaCl zu Lösungen deren p_H -Wert sinkt und infolgedessen in NaCl-reicheren Lösungen niedrigere Hitzeabtötungszeiten zu erwarten sind als in der sonst gleich zusammengesetzten Lösung ohne NaCl-Zusatz.

Als Versuchsgefäße dienten kleine Glasröhrchen von 6 cm Länge und 0,5 cm lichter Weite, Glasdicke 1 mm. Zu Beginn eines jeden Lager- bzw. Sterilisierungsversuches wurden jeweils 50 cm³ des zu prüfenden Substrates hergestellt und mit einer Aufschwemmung der Testmikroben gut vermischt. Von dieser Lösung wurden jeweils 0,5 cm³ in die vorsterilisierten Röhrchen eingefüllt und mit einem ebenfalls vorsterilisierten Pfropfen aus Zellstoffwatte verschlossen. Die voraussichtlich benötigte Anzahl von so vorbereiteten Röhrchen wurde dann der im Versuchsplan vorgesehenen Behandlung unterworfen. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme wurde jeweils aus drei Röhrchen mittels einer sterilen Pipette der Inhalt entnommen und zu Platten verarbeitet. Diese Methode bot eine verhältnismäßig gute Gewähr, daß die Lösungen nicht infolge der zahlreichen Probenentnahmen infiziert wurden, so daß die Lagerung lange genug ausgedehnt werden konnte.

Freilich ist anzunehmen, daß sich die Mikroorganismen, besonders in den hochkonzentrierten hochviskosen Zuckerlösungen, nicht immer ganz gleichmäßig verteilen ließen. Damit mag es auch zusammenhängen, daß die einzelnen Meßpunkte sehr stark streuen. Jedoch war bei einer genügend großen Zahl der Einzelbestimmungen ein einigermaßen befriedigendes Ergebnis der statistischen Auswertung erreichbar. Höhere Zuckerkonzentrationen als 77–78% konnten aber nicht in die Versuche einbezogen werden, da mit derart viscosen Lösungen keine reproduzierbaren Werte mehr zu erzielen waren.

Die Sterilisierungsversuche wurden in der Weise durchgeführt, daß die oben beschriebenen Versuchsröhrchen in einem Ultrathermostaten nach HÖPPLER bis zum Rande in Wasser der gewünschten Temperatur versenkt wurden. Um Unterschiede in der Geschwindigkeit der Wärmeübertragung bei verschieden hoch konzentrierten Lösungen möglichst wenig ins Gewicht fallen zu lassen, wurden eine Sterilisierzeit von 1 Std. und entsprechend niedrige Temperaturen gewählt. Im folgenden werden bei Besprechung der Sterilisierungsversuche für die einzelnen in die Untersuchungen einbezogenen Mikroorganismenarten Ergebnisse angeführt, die bei bestimmten Sterilisiertemperaturen gewonnen wurden, die aber lediglich einen Ausschnitt aus einer weit größeren Anzahl von Sterilisierungsversuchen darstellen, die bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt wurden. Die den Tabellen zugrunde liegenden Temperaturen wurden so gewählt, daß die charakteristischen Unterschiede im Verhalten der Mikroorganismen abhängig von der Konzentration der Lösung möglichst deutlich erkennbar sind. Wurde auf niedrigere als die in den Tabellen angegebenen Temperaturen erhitzt, so starben überhaupt keine oder nur wenige Mikroorganismen ab, und der Einfluß der Konzentration der Lösung konnte daher nicht erkannt werden. Umgekehrt starben bei Anwendung zu hoher Temperaturen in allen zu prüfenden Lösungen sämtliche vorhandenen Mikroorganismen ab, so daß wiederum

die konzentrationsbedingten Unterschiede in den Überlebensquoten nicht festzustellen waren.

Nach Abschluß der Behandlung bei hohen Temperaturen wurden die betreffenden Proben in Wasser von 10° C gekühlt und anschließend zu Platten verarbeitet.

Die Feststellung der Überlebensquoten erfolgte, wie bereits angedeutet, mittels Unterkulturen auf KOCHSchen Platten. Als Substrat diente dabei für Hefen und Schimmelpilze Malznähragar von p_H 4,5 (10% Malzextrakt), für die Bakterien Pepton-Bouillon-Dextroseagar (5 g Pepton, 3 g Liebig's Fleischextrakt, 10 g Dextrose/l H_2O) von p_H 7. In Vorversuchen wurde geprüft, ob und inwieweit die überlebenden Mikroben durch die Übertragung aus den hochkonzentrierten Substraten in weniger konzentrierten Agar, vielfach noch unter Einschaltung von Verdünnungswasser, geschädigt werden. Vergleichsweise wurde anstelle von reinem Verdünnungswasser eine 40% ige Dextroselösung und anstelle des gewöhnlichen Agars solcher mit 40% Zuckerzusatz verwendet. Diese Maßnahme ergab aber keine höheren Überlebensquoten, so daß bei der Durchführung der Hauptversuche, über die hier berichtet wird, wieder darauf verzichtet wurde.

Die Platten mit Hefen und Schimmelpilzen wurden 4 Tage bei 20° C bebrütet, diejenigen mit *Bacillus* sp. 3 Tage bei 30° C, diejenigen mit *Staphylococcus aureus* 2 Tage bei 37° C.

V Versuchsergebnisse

1. Absterbeverlauf von *Saccharomyces cerevisiae* in hochkonzentrierten Zucker- und NaCl-Lösungen bei 20° C

Abb. 1 und 2 zeigen eine Reihe von Meßpunkten für den Absterbeverlauf von *Sacch. cerevisiae* in Zuckerlösungen von 77% und 60%, entsprechend 69 und 85% rel. L. F.¹ und in NaCl-Lösungen von 24% und 16%, entsprechend 82,2 und 88,6% rel. L. F.² bei 20° C. Man sieht, daß die vorhandenen Hefezellen in den hochkonzentrierten Lösungen allmählich absterben. Die „Absterbekonstanten“ (Definition siehe weiter unten) sind bei den in den Abbildungen dargestellten Versuchen als annähernd konstant aufzufassen. Diese annähernde Konstanz der „Absterbekonstanten“ wurde aber nicht immer erzielt. Wiederholt starben in den ersten Stunden der sich über Tage hinziehenden Absterbeversuche unverhältnismäßig viele Individuen ab, und erst bei weiterem Verlauf des Versuches ergab sich ein gleichmäßiger Verlauf des Absterbens. Diese Erscheinung, die nicht regelmäßig, sondern nur bei einzelnen der zahlreichen unter verschiedenen Temperaturen durchgeführten Versuchsvarianten beobachtet wurde, hängt wohl mit der Versuchsanstellung zusammen, konnte aber noch nicht sicher erfaßt und erklärt werden. Auch aus den in Abb. 1 und 2 dargestellten Meßpunkten und aus solchen anderer hier nicht veröffentlichter Versuche läßt sich der exakte Verlauf der Absterbekurven nicht absolut sicher verfolgen. Insbesondere dürfte schwer zu entscheiden sein, ob ein Eintreffervorgang vorliegt oder ob es sich um

¹ Alle im folgenden angeführten Gleichgewichtsfeuchtigkeiten für Zuckerlösungen stammen aus der bei SCHACHINGER u. HEISS (1951) angegebenen Kurve.

² Alle im folgenden angeführten Gleichgewichtsfeuchtigkeiten für NaCl-Lösungen sind nach WALTER zitiert oder auf Grund der dortigen Angaben interpoliert.

einen $2 \times$ Eintreffervorgang handelt, wie dies WEINFURTNER u. VOERKELIUS (1955) für diploide Hefen, zu denen auch *Sacch. cerevisiae* zählt, annehmen. Immerhin wurde versucht, für das Beispiel, für welches die meisten experimentell ermittelten Absterbequoten zu verschiedenen Zeitpunkten vorliegen, nämlich für das Absterben in 77% iger und in 60% iger Fructoselösung bei 20° C die Entscheidung zu treffen, ob ein Eintreffer- oder ein $2 \times$ Eintreffervorgang anzunehmen ist. Zu diesem Zweck wurden anhand der zu verschiedenen Zeitpunkten festgestellten Zahl an Überlebenden die Absterbekonstanten k unter Annahme beider Arten von Vorgängen berechnet.

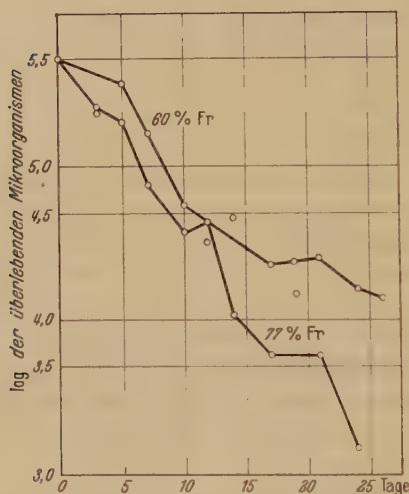


Abb. 1. Absterben von *Saccharomyces cerevisiae* in Zuckerlösungen von 77% und 60% Fructose bei 20° C

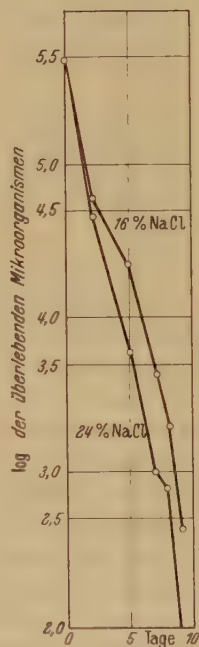


Abb. 2. Absterben von *Saccharomyces cerevisiae* in NaCl-Lösungen von 24% und 16% NaCl bei 20° C

k_1 bedeutet im folgenden die Absterbekonstante unter Annahme eines Eintreffervorganges, k_2 unter Annahme eines $2 \times$ Eintreffervorganges. N_0 bedeutet die Zahl der zur Zeit $t = 0$ vorhandenen Individuen. N die jeweils Überlebenden, t die Zahl der abgelaufenen Zeiteinheiten, in unserem Falle Tage. Formeln und Symbole sind WEINFURTNER u. JANOSCHEK (1953) entnommen.

Es gilt für die Annahme eines Eintreffervorganges (entsprechend der Reaktionsgleichung einer monomolekularen Reaktion): $N = N_0 \cdot e^{-k_1 t}$, woraus sich folgende durchschnittlichen k_1 -Werte ergeben:

Bei 77% Zucker: $k_{1/77} = 0,23 \pm 0,012$; mittlerer Fehler 5,2% des Mittelwertes.

Bei 60% Zucker: $k_{1/60} = 0,19 \pm 0,018$; mittlerer Fehler 9,5% des Mittelwertes.

Für die Annahme eines $2 \times$ Eintreffervorganges gilt die Gleichung: $N = N_0[1 - (1 - e^{-k_1 t})^2]$, woraus sich folgende k_2 -Werte errechnen lassen:

$k_{2/77} : 0,30 \pm 0,023$; mittlerer Fehler 7,7% des Mittelwertes. — $k_{2/60} : 0,26 \pm 0,028$; mittlerer Fehler beträgt 11% des Mittelwertes.

Aus diesen Daten und aus den Überlebensquoten selbst läßt sich damit nicht mit Bestimmtheit die Entscheidung fällen, ob ein Eintreffer- oder ein $2 \times$ Eintreffervorgang vorliegt. Spekulationen über die Wahrscheinlichkeit der einen oder anderen Annahme haben schwerlich Wert.

Den im folgenden noch anzuführenden Berechnungen bei diesen und anderen Versuchsserien, die ja in erster Linie der allgemeinen Klärung und Orientierung dienen sollen, wird der Einfachheit halber die Annahme eines Eintreffervorganges zugrundegelegt, ohne daß damit eine endgültige Stellungnahme zu dem angeschnittenen Fragenkomplex bezogen werden soll.

2. Beziehungen zwischen der NaCl- bzw. Zuckerkonzentration und dem Absterben von *Saccharomyces cerevisiae*

Aus den den Abb. 1 und 2 zugrundeliegenden Versuchen wird deutlich, daß bei einer gegebenen Temperatur das Absterben sämtlicher in einer konzentrierten NaCl- oder Zuckerlösung vorhandenen Mikroorganismen um so schneller vonstatten geht, je höher die Konzentration ist.

Die Beziehungen zwischen Absterbeverlauf und Konzentration der Lösung lassen sich nach RAHN (1945) mittels folgender Gleichung erfassen:

$$\frac{K_1}{K_2} = \left(\frac{c_1}{c_2} \right)^n.$$

c_1 und c_2 bedeuten dabei die zu vergleichenden Konzentrationen, K_1 und K_2 die beiden Konzentrationen entsprechenden Absterbekonstanten.

Die in obiger Gleichung verwendete Absterbekonstante K steht mit der im vorigen Abschnitt zugrunde gelegten Absterbekonstanten k in der Beziehung: $K = 0,434 k$.

Für den Vergleich der durchschnittlichen Absterbekonstanten von *Sacch. cerevisiae* in 77%iger und 60%iger Fructoselösung (Abb. 1) bei 20° C ergibt sich nach obiger Gleichung ein Wert $n \approx 1$ (0,9).

Da gleichzeitig die Beziehung gilt: $\frac{K_1}{K_2} = \frac{t_2}{t_1} = \left(\frac{c_1}{c_2} \right)^n$, bedeutet dies, daß bei $n = 1$ das Absterben aller vorhandenen Hefezellen oder desselben Prozentsatzes bei der doppelten Zuckerkonzentration in der halben Zeit stattfinden würde.

Für den Vergleich der nach den Meßwerten der Abb. 2 berechneten Absterbekonstanten K für das Absterben von *Sacch. cerevisiae* in einer 24- und 16%igen NaCl-Lösung wurde analog $n = 0,67$ berechnet. Wollte man also die Geschwindigkeit des Absterbens verdoppeln, müßte man

von einer Konzentration von 16% NaCl auf eine solche von etwa 45% NaCl übergehen.

Allmähliches Absterben der eingebrachten Hefezellen in NaCl-haltigen Lösungen wurde bis herab zu einer NaCl-Konzentration von 14% beobachtet. Dagegen wurde bei Konzentrationen unterhalb 12% mit Sicherheit Vermehrung der Hefezellen festgestellt. Die Vermehrung war um so langsamer, je höher die NaCl-Konzentration war. Die Grenzkonzentration zwischen Zu- und Abnahme muß also für *Sacch. cerevisiae* bei pH 4,5, 20° C und optimalen Ernährungsverhältnissen zwischen 12 und 14% NaCl, entsprechend 90—91% relativer Luftfeuchtigkeit liegen. Analog war in synthetischer Nährlösung bei 20° C und pH 4,5 die Grenze zwischen Vermehrung und Abnahme von *Sacch. cerevisiae* zwischen 47 und 50% Monose, entsprechend 93—91% relativer Luftfeuchtigkeit, festzustellen. Der Wert entspricht etwa den Befunden von ERICKSON u. FABIAN (1942) und von SCHACHINGER u. HEISS (1951). In mit Monose versetzter Malznährbrühe liegt die Grenze zwischen Zu- und Abnahme für *Sacch. cerevisiae* unter sonst gleichen Bedingungen anscheinend bei etwas höheren Konzentrationen, nämlich bei 55% Monose, entsprechend 88% relativer Luftfeuchtigkeit. Der Bereich der Grenzkonzentration zwischen Zu- und Abnahme liegt bei NaCl- und zuckerreichen Lösungen etwa im gleichen Intervall der Gleichgewichtsfeuchtigkeit bzw. des osmotischen Drucks. Dies spricht dafür, daß in beiden Fällen tatsächlich der hohe osmotische Wert als keimtötendes Agens wirkt und damit gegen die Annahme einer spezifischen Giftwirkung des NaCl.

Die Vermehrung bzw. Abnahme der Hefezellen ist im Bereich der Grenzkonzentration stark verlangsamt, so daß der Eindruck eines statischen Zustandes erweckt werden kann. Offenbar strebt aber, ebenso wie es für die Wirkung von Konservierungsmitteln gezeigt wurde (v. SCHELHORN 1953), jedes System — Hefezellen in Nährlösung mit NaCl bzw. Zucker — entweder dem Endziel der Vergärung oder demjenigen der Sterilität zu und ein lediglich statischer Zustand dürfte bei nicht im Sporenzustand vorliegenden Mikroorganismen nur einen idealen Grenzfall darstellen.

3. Allgemeine Beziehungen

zwischen dem konzentrationsbedingten Absterben von Saccharomyces cerevisiae und der Temperatur

Das Absterben der Hefezellen unter der Wirkung hoher NaCl- und Zuckerkonzentrationen verlief um so rascher, je höher die Temperatur war. Es wurde versucht, den Wert Q_{10} , der ein Maß für die Beschleunigung des Absterbeverlaufes mit steigender Temperatur darstellt, zu ermitteln. Es wurden zunächst die K -Werte bei verschiedenen Temperaturen zwischen 0 und 50° C festgestellt.

Nach der Beziehung $K_{T+N}t = K_T Q_1^N t$ (RAHN 1945) läßt sich Q_1 bzw. Q_{10} für jeden Temperaturbereich $T + N$ berechnen. Q_{10} scheint innerhalb des letalen Konzentrationsbereiches weitgehend von der Konzentration der Lösung unabhängig und bei konzentrierten NaCl- und Zuckerlösungen (geprüft zwischen 16 und 24 % NaCl, 65—77 % Fructose) etwa gleichgroß zu sein. Dagegen ist Q_{10} abhängig von der Temperatur. K_T bedeutet dabei Absterbekonstante K (vgl. S. 45) bei einer Temperatur T° , K_{T+N} die Absterbekonstante bei der höheren Temperatur $T + N^\circ$, N somit die Temperaturdifferenz. Q_1 ist der Temperaturkoeffizient bei Zunahme der Temperatur um 1° , Q_{10} der Temperaturkoeffizient bei Zunahme der Temperatur um 10° , t die gewählte Zeiteinheit.

Tab. 1 zeigt Durchschnittswerte für Q_{10} , wie sie aus zahlreichen bei verschiedenen Konzentrationen durchgeführten Absterbeversuchen ermittelt wurden.

Tabelle 1. Q_{10} -Werte für das Absterben von *Sacch. cerevisiae* in hochkonzentrierten NaCl- und Zuckerlösungen

Temperaturdifferenz:	0—30° C	30—50° C
in NaCl	2,34 ± 0,17	6,71 ± 0,25
in Zucker	2,78 ± 0,40	6,43 ± 0,60

Es wurde versucht, an einem Beispiel, nämlich NaCl-Lösung von 24 %, die Schwankung des Wertes Q_{10} in Abhängigkeit von der Temperatur noch genauer zu analysieren. Dabei wurde festgestellt: Der Wert Q_{10} liegt bei nicht letalen Temperaturen (geprüft Q_{10} im Bereich 34/30, 30/20, 20/10, 10/0 ° C) um 2. Statistisch gesicherte Schwankungen von Q_{10} in Abhängigkeit von der Temperatur konnten in diesem Temperaturbereich nicht gefunden werden. Dies ist auch verständlich. Ein veränderlicher Q_{10} -Wert für das konzentrationsbedingte Absterben wäre dann zu erwarten, wenn diesem Vorgang, der analog zahlreichen chemischen Vorgängen mit zunehmender Temperatur gleichmäßig beschleunigt wird, ein anderer Faktor entgegenwirken würde. Ein solcher Faktor wäre die Vermehrung der Mikroorganismen, die bei von 0° C zum Optimum ansteigender Temperatur ungleichmäßig beschleunigt wird (SCOTT 1937, CHRISTOPHERSEN 1953). In unserem Falle findet aber keine Vermehrung der Hefezellen statt, da diese eben durch die letale Konzentration unterbunden wird. Anders liegen die Verhältnisse bei hypermaximalen, letalen Temperaturen. Hier kombinieren sich zwei Faktoren, nämlich die mit steigender Temperatur beschleunigte konzentrationsbedingte Abtötung und die ebenfalls mit steigender Temperatur beschleunigte Hitzeabtötung. So ist es nicht verwunderlich, daß die Q_{10} -Werte für das Absterben in konzentrierten NaCl- und Zuckerlösungen im Bereich 34/40 und 40/50° C als um 6 liegend ermittelt wurden.

Von Interesse ist ferner die Frage, wie sich die Grenzkonzentration zwischen Zu- und Abnahme der Hefezellen unter dem Einfluß hoher NaCl- und Zuckerkonzentrationen in Beziehung zur Temperatur verschiebt. Früher wurde gezeigt (v. SCHELHORN 1953), daß bei tieferen und damit für die Vermehrung von Hefen ungünstigeren Temperaturen bereits Konzentrationen an Zellgiften zum Absterben führen, die bei für die betreffende Mikrobenart optimalen Temperaturen lediglich eine Verlangsamung der Vermehrung bewirken. Die Grenzkonzentration zwischen Zu- und Abnahme erwies sich also als temperaturabhängig. Es lag nahe, nachzuprüfen, wie die Verhältnisse in dieser Hinsicht beim Absterben der Hefezellen unter der Wirkung hoher NaCl- und Zuckerkonzentrationen liegen.

Versuche bei 0° C und bei 20° C ergaben, daß die Grenze zwischen Zu- und Abnahme bei beiden Temperaturen im gleichen Konzentrationsbereich lag.

4. Beziehungen zwischen dem durch hohe Temperaturen bedingten Absterben von Saccharomyces cerevisiae und der NaCl- bzw. Zuckerkonzentration der Lösung

Der hier behandelte Fragenkomplex stellt im Grunde genommen einen Teil der im vorigen Abschnitt besprochenen Probleme dar. Die Frage, wie sich hohe NaCl- bzw. Zuckerkonzentrationen in Verbindung mit letalen Temperaturen auswirken, ob also die Wirkung einer Hitze-sterilisierung durch hohe NaCl- oder Zuckerkonzentrationen abgeschwächt oder verstärkt wird, darf jedoch auf besonderes Interesse rechnen.

Tab. 2 zeigt das Ergebnis von Versuchen, bei welchen *Sacch. cerevisiae* bei verschiedenen hohen Zusätzen von NaCl bzw. Fructose 1 Std lang auf 52° C gehalten wurde.

Hohe Kochsalzkonzentrationen wirken also in dem Sinne, daß mehr Zellen unter der Wirkung der Behandlung bei 52° C abstarben als in Lösungen mit niedrigem NaCl-Gehalt oder in NaCl-freien Lösungen. Bei den Versuchen in Lösungen mit verschiedenen Fructosezusätzen bei 52° C ergibt sich bei mittleren Zuckerkonzentrationen (im Versuch ab 30% Fructose) eine deutliche Schutzwirkung des Zuckers in dem Sinne, daß bei gleicher Behandlung bei 52° C in diesen Lösungen weniger Hefezellen abstarben als in Lösungen ohne oder mit nur geringen Zusätzen von Zucker. Bei hohen Zuckerkonzentrationen (im Versuch ab 50%) wurde wieder ein Absinken der Überlebensquoten festgestellt, jedoch nicht so ausgeprägt wie bei Anwesenheit hoher NaCl-Konzentrationen. Die Überlebensquoten waren in den höchstkonzentrierten der geprüften Zuckerlösungen noch höher als in der Vergleichslösung ohne Zucker. Inwieweit sich trotz den bereits beschriebenen Vorsichtsmaßnahmen bei der Erhitzung der hochkonzentrierten Fructoselösungen auf 52° C doch

noch Caramellisationsprodukte bildeten und das Ergebnis beeinflussen, kann nicht entschieden werden. Auch die Prüfung der Wirkung noch höherer als der verwendeten Zuckerkonzentrationen wäre in diesem Zusammenhang interessant gewesen, ließ sich aber infolge der zu hohen Viskosität solcher Lösungen nicht mit der nötigen Genauigkeit durchführen.

Die mit *Sacch. cerevisiae* gefundenen Beziehungen über das Zusammenwirken von Hitzesterilisation und hohen NaCl- bzw. Zuckerkonzentrationen lassen sich mit bereits früher beschriebenen Befunden gut vereinbaren. So gibt eine Reihe von Autoren an, daß in kochsalzreichen Lösungen niedrigere Temperatur-Zeitwerte zum Absterben der vorhandenen Mikroorganismen führen als in kochsalzfreien oder kochsalzarmen Medien (ANDERSON u. Mitarb. 1949, dort ältere Literatur zitiert). An anderer Stelle findet sich die Angabe (VILJOEN 1936), daß mäßige NaCl-Zusätze eine gewisse Schutzwirkung gegenüber der Hitzeabtötung von Mikroorganismen auszuüben vermögen. Wenn auch das in unseren Versuchen festgestellte Optimum von 9% Überlebenden bei 4% NaCl-Zusatz nicht sehr ausgeprägt ist, so widersprechen unsere Befunde doch keinesfalls denjenigen von VILJOEN (1936).

Was die Wechselbeziehungen zwischen Hitzesterilisation und hohem Zuckergehalt des Substrates anbelangt, so wird seit langem die Auffassung vertreten (BAUMGARTNER, 1938; OWEN, 1913; KRUMBHOLZ, 1936), daß durch Vorhandensein höherer Zuckerkonzentrationen in der Lösung die Widerstandsfähigkeit der Mikroorganismen gegenüber hohen Temperaturen gesteigert wird.

Es wurde weiter oben ausgeführt, daß die Grenze zwischen Absterben und Vermehrung für *Sacch. cerevisiae* bei 0—20° C zwischen 12 und 14% NaCl und 47 und 50% Monose liegt. Die NaCl-Konzentration, bei welcher eine Verstärkung der abtötenden Wirkung hoher Temperaturen besonders deutlich einsetzt, liegt offensichtlich im gleichen Konzentrationsbereich (Tab. 2). Bei den Versuchen mit verschiedenen konzentrierten Zuckerlösungen läßt sich diese Parallele nicht mit der gleichen Deutlichkeit ziehen. Aber auch hier ergeben sich die höchsten Überlebensquoten bei Hitzeabtötungsversuchen in Zuckerkonzentrationen, die an sich noch nicht letal wirken, während bei Hitzebehandlung in höchstkonzentrierten Zuckerlösungen die Überlebensquoten wieder etwas absinken.

5. Beziehungen zwischen der Letalwirkung höherer Temperaturen und der NaCl- bzw. Zuckerkonzentration des Substrates bei Mikroorganismen, die gegenüber letzteren Faktoren besonders widerstandsfähig sind

Diese Versuche sollten in erster Linie folgende Frage lösen: Wie verschiebt sich bei Mikroorganismen, die *Sacch. cerevisiae* in der Widerstandsfähigkeit gegen hochosmotische Lösungen erheblich übertreffen, die Grenz-

Tabelle 2. Absterben von Zellen von *Sacch. cerevisiae* in Lösungen mit verschiedenem NaCl- und Zuckergehalt bei einstündiger Erhitzung auf 52° C

Prozent NaCl		0	4	8	10	12	16	20
Zellen/cm ³ vor Erhitzung	. . .	2,0 · 10 ⁵	2,0 · 10 ⁵	2,0 · 10 ⁵	2,3 · 10 ⁵	2,0 · 10 ⁵	2,0 · 10 ⁵	2,0 · 10 ⁵
Überlebende/cm ³	8,0 · 10 ³	1,7 · 10 ⁴	7,0 · 10 ³	4,2 · 10 ³	3,0 · 10 ²	< 100	< 100
Prozent Überlebende	4	9	5	2	0,15	< 0,05	< 0,06
Prozent Zucker		10	30	40	47	50	60	75
Zellen/cm ³ vor Erhitzung	. . .	1,5 · 10 ⁵	1,2 · 10 ⁵	1,5 · 10 ⁵	1,0 · 10 ⁵	1,5 · 10 ⁵	1,3 · 10 ⁵	2,4 · 10 ⁵
Überlebende/cm ³	3,0 · 10 ³	4,0 · 10 ⁴	4,0 · 10 ⁴	1,7 · 10 ⁴	1,5 · 10 ⁴	1,0 · 10 ⁴	1,7 · 10 ⁴
Prozent Überlebende	2	33	27	17	10	8	7

konzentration, bei welcher anstelle einer Abschwächung eine Verstärkung der Letalwirkung hoher Temperaturen einsetzt?

Als Testorganismen dienten die S. 40 genannten Arten. Die Kahlmhefenart *Hansenula anomala* bildete in eigenen Versuchen bei 20° C in Nährlösungen von pH 5 bei einem NaCl-Gehalt bis 14%, entsprechend 90% relativer Luftfeuchtigkeit, noch eine Kahlmdecke, allerdings war das Erscheinen dieser Kahlmdecke im Vergleich zu demjenigen in gleichstark beimpften NaCl-ärmeren Lösungen verspätet. Keine Kahlmdecke mehr wurde bei diesen Versuchen in Nährlösungen mit einem NaCl-Gehalt von 16%, entsprechend 88,6% relativer Luftfeuchtigkeit, gebildet. Kahlmdeckenbildung wurde ferner in eigenen Versuchen noch bei 20° C und bei einem Zuckergehalt von 55% (Invertzucker), entsprechend einer relativen Luftfeuchtigkeit von 89%, festgestellt, dagegen nicht mehr bei einem Invertzuckergehalt von 60% (86% relativer Luftfeuchtigkeit). Bei *Aspergillus niger* wurde bei 20° C Mycelbildung bis zu einem NaCl-Gehalt der Lösung von 18% festgestellt. Sporen wurden nach einem Aufenthalt von 1/2 Jahr in Lösungen von 24% NaCl, entsprechend 82,2% relativer Luftfeuchtigkeit bei 20° C (pH 7) noch lebend gefunden; (noch längere Zeit wurden diese Beobachtungen nicht fortgesetzt). Die *Bacillus* sp. wies nach 2monatiger Lagerung bei 30° C in Nährlösung von pH 7 und Zusätzen von 24% NaCl bzw. 78% Fructose (78% relative Luftfeuchtigkeit) noch keinerlei Abnahme, allerdings auch keine Zunahme auf.

Tab. 3 zeigt Versuche über die Erhitzung von *Hansenula anomala* während 1 Std auf 48° C bei verschiedenen Zusätzen von NaCl bzw. Zucker (Fructose).

Tabelle 3. Absterben von *Hansenula anomala* in Lösungen mit verschiedenem NaCl- bzw. Zuckergehalt bei einstündiger Erhitzung auf 48° C

Prozent NaCl bzw. Zucker	0	12% NaCl	24% NaCl	10% Zucker	78% Zucker
Zellen/cm ³					
vor Erhitzung . .	$9,0 \cdot 10^4$	$6,5 \cdot 10^4$	$8,5 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$
Überlebende/cm ³	$3,0 \cdot 10^2$	$2,2 \cdot 10^4$	$2,3 \cdot 10^4$	$2,0 \cdot 10^2$	$3,2 \cdot 10^4$
Überlebende in Prozent	0,3	34	27	0,2	27

Bei der Konzentration von 24% NaCl bzw. von 78% Zucker wurde weit besseres Überstehen der Behandlung bei 48° C festgestellt als in kochsalzfreiem und zuckerarmem Milieu.

Tab. 4 zeigt entsprechende Versuche mit *Aspergillus niger*. Die Sporen dieses Schimmelpilzes wurden 1 Std lang auf 55° C erhitzt.

 Tabelle 4. Absterben von Sporen von *Aspergillus niger* in Lösungen mit verschiedenem NaCl- bzw. Zuckergehalt bei einstündigem Erhitzen auf 55° C

Prozent NaCl bzw. Zucker	0	12% NaCl	24% NaCl	10% Zucker	78% Zucker
Sporen/cm ³ vor Erhitzung . . .	$4,5 \cdot 10^3$	$5,7 \cdot 10^3$	$7,5 \cdot 10^3$	$9,5 \cdot 10^3$	$10,5 \cdot 10^3$
Überlebende/cm ³	> 100	> 100	$3,3 \cdot 10^3$	> 100	$10,5 \cdot 10^3$
Überlebende in Prozent	> 24	> 2	44	> 1	100

Auch in diesem Falle war bei den höchsten in den Versuch einbezogenen NaCl- bzw. Zuckerkonzentrationen der Prozentsatz der Überlebenden weit höher als in NaCl- bzw. zuckerärmeren Lösungen.

Tab. 5 zeigt Versuche über die Erhitzung von *Bacillus* sp. (1 Std bei 87° C) in Lösungen mit verschieden hohem NaCl- bzw. Fructosezusatz. Auch hier konnte festgestellt werden, daß die Behandlung bei letalen Temperaturen in hochkonzentrierten NaCl- und Zuckerlösungen weit besser ertragen wird.

 Tabelle 5. Absterben von *Bacillus* sp. in Lösungen mit verschieden hohen NaCl- und Zuckerzusätzen bei einstündigem Erhitzen auf 87° C

Prozent NaCl bzw. Zucker	0	12% NaCl	24% NaCl	10% Zucker	60% Zucker	75% Zucker
Zellen/cm ³ vor Erhitzung . .	$6,3 \cdot 10^5$	$7,1 \cdot 10^5$	$8,9 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^6$
Überlebende/cm ³	$6,5 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^5$	$7,0 \cdot 10^3$	$9,5 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^6$
Überlebende in Prozent	1	15	34	0,6	95	100

Vergleicht man die Versuchsergebnisse, die mit *Sacch. cerevisiae* gewonnen wurden, mit dem Verhalten der gegenüber hohen osmotischen Werten widerstandsfähigeren Arten, so sieht man, daß die Mikroorganismen je nach ihrer Widerstandsfähigkeit in verschiedener Weise auf das Zusammenwirken letaler Temperatur-Zeit-Werte und hoher osmotischer Werte reagieren. Hochkonzentrierte NaCl-Lösungen, die bei *Sacch. cerevisiae* die abtötende Wirkung der Hitzebehandlung verstärkten, übten bei widerstandsfähigeren Arten offenbar eine schützende Wirkung aus. Bei den Versuchen mit Zucker war die Verstärkung der abtötenden Wirkung höherer Temperaturen durch höchstkonzentrierte Lösungen auch gegenüber *Sacch. cerevisiae* nicht sehr deutlich. Um so weniger ist es verwunderlich, daß bei den Versuchen mit widerstandsfähigeren Arten auch höchstkonzentrierte Zuckerlösungen lediglich eine Schutzwirkung bei der Hitzesterilisierung auszuüben vermögen.

6. Verhalten von Mikroorganismen, die gegenüber hohen osmotischen Werten weniger widerstandsfähig sind als *Saccharomyces cerevisiae* unter der kombinierten Wirkung letaler Temperaturen und verschieden hoher NaCl- und Zuckerkonzentrationen

Staphylococcus aureus erwies sich als weniger widerstandsfähig gegenüber hohen NaCl- und Zuckerkonzentrationen als *Sacch. cerevisiae*. Es wurde festgestellt, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen für den verwendeten Stamm von *Staphylococcus aureus* die Grenze zwischen Absterben und Vermehrung bei 37° C und pH 7 zwischen Konzentrationen von 30 und 40% Monose, entsprechend 96—94% relativer Luftfeuchtigkeit lag.

Tab. 6 zeigt Versuche, bei welchen *Staphylococcus aureus* bei verschieden hohen Zusätzen von Fructose 1 Std auf 45° C erhitzt wurde.

Tabelle 6. Absterben von *Staphylococcus aureus* in Lösungen mit verschieden hohen Zuckerkonzentrationen bei einstündiger Behandlung bei 45° C

Prozent Zucker	0	10	30	47
Zellen/cm ³ vor Erhitzung	5,1 · 10 ⁵	5,6 · 10 ⁵	6,7 · 10 ⁵	4,1 · 10 ⁵
Überlebende/cm ³	1,7 · 10 ⁵	3,2 · 10 ⁵	1,5 · 10 ³	2,4 · 10 ³
Überlebende in Prozent . . .	33	56	0,2	0,6

Aus ihr geht deutlich hervor, daß in zuckerreichen Lösungen (in der Tabelle ab 30%) mehr Individuen unter der Wirkung letaler Temperatur-Zeit-Werte zum Absterben kommen als in zuckerfreien oder zuckerarmen Lösungen. Es liegt ein Parallellfall zu der bei den Versuchen mit *Sacch. cerevisiae* festgestellten Wirkung hoher NaCl-Konzentrationen vor. Während bei dieser verhältnismäßig gegen hohe Zuckerkonzentrationen wider-

standsfähigen Art die entsprechende Wirkung hoher Zuckerkonzentrationen nicht sicher erfaßt werden konnte, tritt sie bei den Versuchen mit der empfindlicheren Art *Staphylococcus aureus* deutlich zu Tage. Der Versuch mit *Staphylococcus aureus* rundet somit das Bild der Beziehungen zwischen der abtötenden Wirkung letaler Hitzebehandlung und der NaCl- bzw. Zuckerkonzentration der Lösung ab.

Besprechung der theoretischen und praktischen Ergebnisse der Versuche

Am Beispiel *Sacch. cerevisiae* wurde gezeigt, daß für Mikroorganismen von nicht allzu großer Widerstandsfähigkeit gegenüber hohen NaCl- und Zuckerkonzentrationen ihres Nährsubstrates eine Grenzkonzentration zwischen Vermehrung und Absterben existiert. Bei Konzentrationen unterhalb dieser Grenze findet Vermehrung, bei höheren Konzentrationen Absterben statt. Rein statisches Verhalten der Hefezellen ohne Zu- oder Abnahme stellt einen lediglich bei der Grenzkonzentration anzunehmenden Idealfall vor. Ob dies auch für Schimmelpilz- und Bakteriensporen zutrifft, muß noch geklärt werden. Es ist zu bezweifeln. Die Geschwindigkeit der Vermehrung bzw. des Absterbens ist von der Konzentration und der Temperatur abhängig, außerdem auch noch von weiteren Faktoren, wie Nährstoffgehalt und pH-Wert, auf die nur am Rande eingegangen werden konnte.

NaCl- und zuckerreiche Substrate erleiden aufgrund der geschilderten Verhältnisse bei längerer Lagerung offenbar eine Verarmung in der Zahl der ursprünglich vorhandenen Mikroorganismenarten, indem die gegen hohe osmotische Werte weniger widerstandsfähigen Arten allmählich absterben. So weist ROEDERER (1951) auf die bactericide Wirkung hoher Zuckerkonzentrationen gegenüber nahrungsmittelvergiftenden Bakterien hin.

Die Verarmung eines NaCl- oder zuckerreichen Substrates an Mikroorganismenarten tritt nach den vorliegenden Untersuchungen bei höheren Lagertemperaturen schneller ein als bei kühler Lagerung.

Wir wissen jedoch, daß eine Reihe von Mikroorganismen hohe NaCl-Konzentrationen bis zu gesättigten Lösungen sehr gut erträgt. So sind gewisse *Micrococcus*-Arten geradezu an hochkonzentrierte Salzlösungen angepaßt (Progress Reports, 1949; PETROWA, 1933). Der bereits erwähnte widerstandsfähige Schimmelpilz *Asp. niger* wurde in eigenen Versuchen noch übertroffen durch *Asp. glaucus*. Letzterer entwickelte in Nährlösungen von pH7 bei einem Salzgehalt bis zu 20% NaCl, entsprechend 85% relativer Luftfeuchtigkeit, noch mikroskopisch sichtbares Mycel. Nach ETCHELLS u. BELL (1950) bildeten Angehörige der Kahmhefengattung *Debaryomyces* noch in Lösungen bis zu 20% NaCl Kahmdecken aus. Bis zu ebenso hohen Konzentrationen stellten diese Autoren

Vermehrung von Angehörigen der osmophilen Hefegattung *Zygosaccharomyces* fest¹, die hinsichtlich der Widerstandsfähigkeit gegenüber hohen Zuckerkonzentrationen an der Spitze stehen dürfte (v. SCHELHORN, 1950a). Es wurde festgestellt, daß die Grenze für die Vermehrung der extrem osmophilen Art *Zygosacch. Barkeri* in hochkonzentriertem Fructosesirup bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 62 %, entsprechend etwa 80 % Fructose liegt. Der osmophile Schimmelpilz *Asp. glaucus* vermag nach eigenen Untersuchungen noch in zuckerreichen Substraten im Gleichgewicht mit 72—73 % relativer Luftfeuchtigkeit entsprechend 72 % Fructose, Mycel auszubilden, Sporen werden auch durch höchstkonzentrierte Zuckertlösungen nicht oder nur in sehr langen Zeiträumen abgetötet.

Es ist daher nicht zu erwarten, daß NaCl- oder zuckerreiche Substrate lediglich aufgrund ihres hohen osmotischen Wertes im Verlaufe der Lagerung sicher steril werden.

Was das Zusammenwirken letaler Hitze-Zeit-Werte und hoher osmotischer Werte anbelangt, so ist anzunehmen, daß NaCl- und Zuckerzusätze bis zu einer gewissen Höhe eine Schutzwirkung gegenüber letalen Hitze-Zeit-Werten ausüben, noch höhere Konzentrationen an NaCl oder Zucker dagegen die Wirkung der Hitzesterilisation verstärken. Würde man beim Beispiel des *Staphylococcus aureus* die Zahl der Überlebenden nach einer einstündigen Behandlung bei 45° C in Lösungen mit verschiedenen hoher Zuckerkonzentration in der Weise graphisch darstellen, daß auf der Abszisse die Konzentrationen der Lösung, auf der Ordinate die Überlebenden in Prozenten aufgetragen würden, so hätte diese Kurve einen Gipfelpunkt der Überlebenden bei mittleren Zuckerkonzentrationen. Ein analoges Bild ergibt sich bei einstündiger Behandlung von *Sacch. cerevisiae* in NaCl-Lösungen verschiedener Konzentration bei 52° C. Allerdings ist der Gipfel der Kurve bei 4 % NaCl nur schwach ausgeprägt. Bei Mikroorganismen, die gegen hohe osmotische Werte widerstandsfähiger sind als *Staphylococcus aureus* und *Sacch. cerevisiae*, ist nur der aufsteigende Ast der fraglichen Kurve realisierbar.

Da die Vorgänge, die sich bei der Hitzeabtötung von Mikroben abspielen, noch nicht in allen Punkten geklärt sind, kann auch noch keine absolut sichere Erklärung für die Beziehungen zwischen Hitzeabtötung und osmotischem Wert der Lösung gegeben werden. Auf der Basis der Auffassung, daß das Absterben der Mikrobenezelle bei höheren Temperaturen durch Eiweißkoagulation erfolgt und unter Berücksichtigung der schon von LEWIS (1890) festgestellten Tatsache, daß Eiweiß durch Wasserentzug gegen höhere Temperaturen widerstandsfähiger wird, läßt sich die schützende Wirkung NaCl- und zuckerreicher Lösungen verstehen. Die Fähigkeit der Zellen, sich auf hohe osmotische Werte der Um-

¹ Jetzt mit *Saccharomyces* vereinigt (vgl. LODDER u. KREGER-VAN RIJ, 1952).

gebung durch Wasserabgabe einzustellen, ist jedoch nicht unbeschränkt. Jenseits einer je nach der Mikrobenart verschieden hohen Grenzkonzentration kommt es zu irreversiblen Veränderungen. Diese führen, mögen sie nun im einzelnen in Schädigungen des Plasmas, Aussalzen der Enzyme oder noch anderen Vorgängen bestehen, zum Zelltod. Wird also eine gewisse Grenzkonzentration überschritten und die Mikrobenzelle gleichzeitig letalen Temperaturen ausgesetzt, so wirken zwei Einflüsse im Sinne einer beschleunigten Abtötung zusammen.

Bei Folgerungen aus den Beziehungen zwischen der Konzentration der Lösung an Zucker oder NaCl und der Wirkung letaler Hitze-Zeit-Werte ist folgendes zu berücksichtigen: Die in den vorliegenden Untersuchungen herangezogenen höchsten NaCl- und Zuckerkonzentrationen werden unter praktischen Verhältnissen nur in Ausnahmefällen erreicht. Dagegen ist mit dem Vorhandensein von Mikroorganismen mit sehr hoher Widerstandsfähigkeit gegen hohe osmotische Werte jederzeit zu rechnen. Die angeführten Arten stellen ja keine nur dem Systematiker bekannten Seltenheiten dar, sondern es handelt sich um überall vorkommende, uns im Alltag auf verdorbenem Dauerbrot, auf und in Marmeladen, in Sirupen, auf der Oberfläche wasserarmer Dauerwürste, in salzreichen Laken oder auf und in sonstigen Lebensmitteln von hohem osmotischen Wert häufig begegnende Arten. Der Fall, daß infolge hoher Zuckerkonzentration der absteigende Ast der gedachten Kurve für alle in Betracht kommenden Mikroorganismen anzunehmen ist, wird daher in der Praxis so gut wie nie eintreten. Man wird daher nie voraussetzen dürfen, daß zuckerreiche Substrate aufgrund dieser Eigenschaft einer kürzeren Hitzebehandlung zur Keimfreimachung bedürfen als Substrate von sonst gleicher Zusammensetzung aber niedrigerem Zuckergehalt. Vielmehr wird man erwarten müssen, daß vorhandene niedrige bis — im Sinne unserer Betrachtung — mittlere Zuckerkonzentrationen eine schützende Wirkung auf die vorhandenen Mikroorganismen ausüben. Dabei muß auch noch berücksichtigt werden, daß der Wärmeaustausch mit zuckerreicheren Substraten langsamer erfolgt. Etwas günstiger liegen die Verhältnisse bei der Wirkung höherer Salzgehalte auf die notwendigen Sterilisierzeiten. Hier könnte der Fall möglich sein, daß die erwähnte durch hohen NaCl-Gehalt bedingte Verarmung eines Substrates an Mikroorganismenarten sich in dem Sinne auswirkt, daß gerade die hitze-resistenten Clostridien zurückgedrängt werden. Jedoch kann zu dieser Frage mangels eingehenderer Studien noch nichts Endgültiges gesagt werden.

Zusammenfassung

Es wurde das Absterben verschiedener Arten von Mikroorganismen in hochkonzentrierten NaCl- und Zuckerlösungen untersucht, eingehender bei *Saccharomyces cerevisiae*. Bei dieser Art, die mittlere Widerstandsfähig-

keit gegenüber hohen osmotischen Werten aufweist, wurde zunächst der allgemeine Absterbeverlauf in konzentrierten NaCl- und Zuckerlösungen bei 20° C studiert; eine sichere Entscheidung, ob dieses Absterben nach der Regel eines Eintreffer- oder eines $2 \times$ Eintreffervorganges verläuft, konnte nicht gefällt werden. Sodann wurden die Beziehungen zwischen der NaCl- bzw. Zuckerkonzentration der Lösung und dem Absterbeverlauf untersucht, ferner die Beschleunigung, die das Absterben bei an sich nicht letalen Temperaturen mit steigender Temperatur erleidet, sowie das Zusammenwirken letaler Temperaturen und verschieden hoher NaCl- und Zuckerkonzentrationen. Mit dem Verhalten von *Sacch. cerevisiae* wurde dasjenige von Mikroorganismen mit größerer oder geringerer Resistenz gegenüber hohen osmotischen Werten verglichen. Es ergab sich als allgemeine Regel, daß mittlere NaCl- und Zuckerkonzentrationen in der Lösung die Wirkung letaler Temperaturen abschwächen, während hohe und höchste NaCl- und Zuckerkonzentrationen diese verstärken. Welche Konzentrationen aber im einen oder anderen Sinne wirken und ob im Rahmen des Löslichkeitsbereiches von NaCl- und der verschiedenen Zuckerarten überhaupt eine Verstärkung der abtötenden Wirkung der Hitzebehandlung erfolgt, hängt von der Natur der verschiedenen Mikroorganismen ab.

In der Praxis ist bei der Hitzesterilisierung von Substraten immer auch mit der Anwesenheit von Arten zu rechnen, die gegen hohe osmotische Werte sehr widerstandsfähig sind; daher sind insbesondere zuckerreiche Substrate eher länger als solche von niedrigerem osmotischen Wert zu sterilisieren.

Literatur

- ANDERSON, E. E., W. B. ESSELEN jr. and C. R. FELLERS: Effect of acids, salt, sugar and other food ingredients on thermal resistance of *Bacillus thermoacidurans*. Food Res. 14, 499—510 (1949). — BAUMGARTNER, J. G.: Heat sterilized reducing sugars and their effects on the thermal resistance of bacteria. J. Bacter. 36, 369—382 (1938). — CHRISTOPHERSEN, J.: in PRECHT-CHRISTOPHERSEN-HENSEL: Temperatur und Leben. S. 191. Springer 1955. — ERICKSON, F. J., and F. W. FABIAN: Preserving and germicidal action of various sugars and organic acids on yeasts and bacteria. Food Res. 7, 68—79 (1942). — ETCHELLS, J., and TH. A. BELL: Film yeasts on commercial cucumber brines. Food Technol. 4, 77—83 (1950). — KRUMBHOLZ, G.: Neue Forschungen über die Gärungsvorgänge in zuckerreichen Lebensmitteln. Die Obst- und Gemüseverwertungsindustrie 23, 70—72, 85—87, 96—99, 113, 114 (1936). — LEWIS, S.: Über die Ursache der Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen hohe Temperaturen. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 26, 341—354 (1890). — OWEN, W. L.: The occurrence of *Saccharomyces Zopfii* in cane sirups and variation in its resistance to high temperatures when grown in solutions of varying densities. Zbl. Bakter. II, 39 (1913). — PETROWA, E. K.: Mikrobiologie des Kochsalzes. Arch. Mikrobiol. 4, 326—347 (1933). — Progress Reports of the Atlantic Coast Stations (Fisheries Research Board of Canada) 44, 1949. — RAHN, O.: Injury and death of bacteria by chemical agents. Normandy, Missouri: Biodynamica 1945. — ROEDERER, H.: Bakteriostatische und bactericide Wirkungen

der Zucker auf nahrungsmittelvergiftende Bakterien. Die Stärke **3**, 311—317 (1951). — SCHACHINGER, L., u. R. HEISS: Osmotischer Wert und Mikroorganismenwachstum in Zuckerlösungen. Arch. Mikrobiol. **16**, 347—357 (1951). — SCHELHORN, M. v.: Verderb von Lebensmitteln durch osmophile Hefen. ZUL **91**, 117—124 (1950a); Grenzkonzentrationen für den osmophilen Schimmelpilz *Aspergillus glaucus* in Abhängigkeit vom pH-Wert des Substrates. ZUL **91**, 338—342 (1950b). — Hemmende und abtötende Wirkung von Konservierungsmitteln. Arch. Mikrobiol. **19**, 30—44 (1953). — Absterben von Mikroorganismen unter der Wirkung hoher NaCl- und Zuckerkonzentrationen. Referat auf X. congreso internacional de industrias agricolas Madrid, Mai 1954. — SCOTT, W. J.: The growth of microorganisms on ox muscle. II. The influence of temperature. J. of the Council for Scientific and Industrial Research, **10**, 338—350 (1937). — VILJOEN, J. A.: Heat resistance studies. 2. The protective effect of sodium chloride on bacterial spores heated in pea liquor. J. Inf. Dis. **39**, 286—290 (1936). — WALTER, H.: Die Hydratur der Pflanze. Jena: Fischer 1931. — WEINFURTNER, F., u. A. JANOSCHEK: Treffergesetz und biologische Analyse. Brauwissenschaft **1953**, 65—70. — WEINFURTNER, F., u. G. A. VOERKELIUS: Das Absterben von Hefen unter der Einwirkung von Noxen in Abhängigkeit vom Ploidie-Grad. Naturwissenschaften **42**, 20, 21 (1955).

(The Tokugawa Institute for Biological Research and the Nagao Institute, Tokyo)

A New Form of *Streptomyces* Capable of Growing Autotrophically

By

ATUSI TAKAMIYA and KEISUKE TUBAKI

With 9 figures in the text

(Eingegangen am 9. April 1956)

Although a great deal is known about the bacteria which can grow in purely inorganic media, nothing has been reported on the chemo-autotrophs which belong to other groups of micro-organisms. In the present paper we report evidence that there is a form of *Streptomyces* which is able to grow chemo-autotrophically.

The discovery of this new organism was a matter of contingency. A solution of phosphate buffer which had been left unused for a long time was found to be covered with a thin layer consisting of minute white particles. Attentive observation from time to time seemed to indicate a continuous, though extremely slow, growth of powder-like colonies. A loopful of the organism transferred to a sterilized inorganic nutrient medium showed active growth, eventually covering the whole surface of the liquid, provided that the culture was placed inside the laboratory. It was found that the factor supporting the growth of the organism was the coal gas which leaked out in minute quantities somewhere in the laboratory. In fact, growth was markedly accelerated when the culture was supplied with a mixture of the gas and air. By investigating the effect of various gases upon the culture, it was revealed that the effective component contained in the gas was nothing but hydrogen. Besides hydrogen, oxygen and carbon dioxide were required for the growth of the organism, a fact indicating that it assimilated carbon dioxide by using the energy derived from the oxy-hydrogen reaction.

The isolation of the organism was easily attained by repeated transfers of conidiospores formed on the upper surface of the colony; each time the purity of the culture was tested by smearing part of the culture on a broth-agar slant. The organism is a facultative autotroph, being able to grow heterotrophically if supplied with adequate organic nutrients. Microscopic examination as well as inspection with the naked eye showed that the organism has every characteristic of the genus *Streptomyces*,

a group among which no autotrophic form has ever been reported (BREED *et al.* 1948; WAKSMAN *et al.* 1954; FRY *et al.* 1954; LEES 1955). Described herein are the main characteristics of this new organism, for which we propose the name *Streptomyces autotrophicus*.

Description of the Species

Streptomyces autotrophicus, TAKAMIYA *et* TUBAKI, nov. sp.

The most salient feature of this species is its capacity for growing on inorganic media free from any trace of organic carbon sources. Carbon dioxide supplied either in gaseous form or as sodium bicarbonate is utilized as the sole source of carbon in the autotrophic development. The energy for this assimilation is obtained by the oxidation of molecular hydrogen. The presence of coal gas in the atmosphere effectively supports the autotrophic growth of the organism (the appropriate ratio of the gas and air being in the range from 1 : 3 to 3 : 1). Components of coal gas other than hydrogen, *i. e.*, carbon monoxide, methane and acetylene, either individually or given simultaneously, are not utilized by the organism. It is strictly aerophilic; the formation of colonies occurs only on the surface of the medium, and the growth becomes extremely sluggish if the colonies are submerged in the liquid medium. As nitrogen source it utilizes urea, ammonium as well as nitrate salts, but not molecular nitrogen. The organism can also grow heterotrophically at a rate that is greater than that of its autotrophic growth. Repeated subculturing on richly nutritive organic media (*e. g.* peptone broth) does not deprive the organism of its capacity for further growth on inorganic media.

The organism is not authentically chromogenic, although pale yellow to brownish yellow pigments are produced in older cultures on some organic media (peptone, glucose). No characteristic odour is recognized in autotrophic growth. On some organic media a faint earthy odour is present.

The optimal temperature for autotrophic growth is about 28–30°C.; no growth occurs at 45°C. The organism, especially in its conidial form, is markedly tolerant against drought and starvation. The culture could be revived even from a white crust of cells adhering to the surface of a dried agar slant more than three years old.

Colonies usually snow-white in appearance, because of the abundance of aerial hyphae covering the upper part of the colonies. When the formation of aerial hyphae is scanty (see later), the colonies assume a yellowish tint which is the colour of the vegetative mycelia. No guttation of liquid droplets on colony surface.

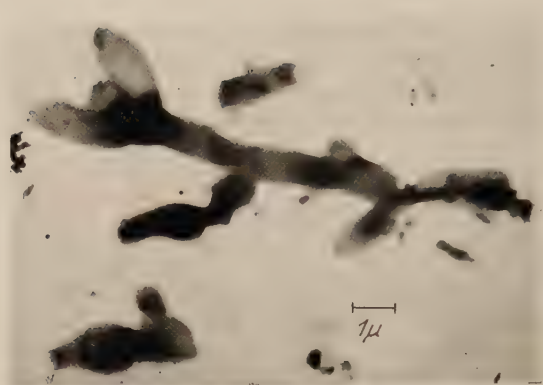


Fig. 1. Electron micrograph of vegetative hyphae; fragments from the mycelial texture of a colony floating on the surface of peptone-broth. (19 days; 25° C.)

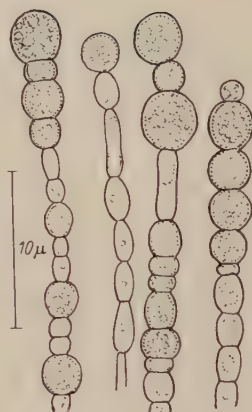


Fig. 2. Chlamydospores (Malt-agar; 7 months, 25° C.)



Fig. 3. Conidiophores with conidia. (Glucose-broth agar; 10 days, 25° C.)

Vegetative hyphae yellowish, branched at very short intervals, and entangled to give rise to a lichenoid texture, with occasional formation of round, swollen cells (chlamydospores) (fig. 1).

Chlamydospores intercalary or terminal, usually spheroid to ovoid, $1.8\text{--}2.5\ \mu$ in diameter, pale yellow; abundantly formed in older cultures, especially in heterotrophic growth on complex nutrients (glucose, peptone) (fig. 2).

Aerial hyphae 0.5 to $1.0\ \mu$ in diameter, colourless, entangled, sinuous but show no spiral formation, alternately or irregularly branched; branches breaking up into conidia (fig. 3, 4 and 5).

Conidia colourless with smooth surface; vary in shape from ellipsoid to long ovoid or cylindrical; usually $2.5\text{--}4.3 \cdot 0.5\text{--}0.8\ \mu$, sometimes smaller, $1.5 \cdot 0.3\ \mu$ (fig. 6).

Culture on inorganic salt solution¹: Chemo-autotrophic growth in oxy-hydrogen gas mixture very slow. Colony at first powdery-white in appearance (see fig. 7); later, forming patches of thin, flat film covering

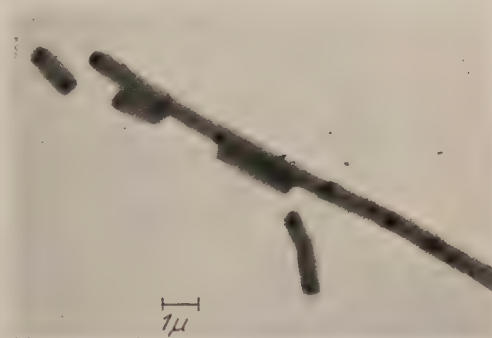


Fig. 4. Electron micrograph of a young conidiophore: Conidia from other mature conidiophores are seen adhering to it. (Inorganic nutrient solution; 30 days at room temperature)

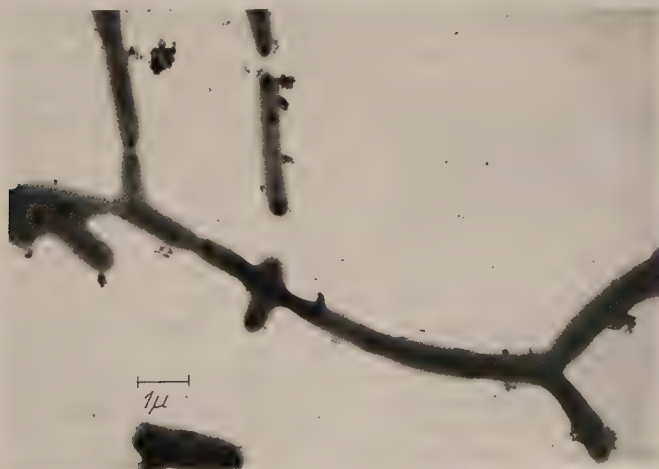


Fig. 5. Electron micrograph of aerial hyphae with conidia. (The same culture as above)

whole liquid surface (fig. 8); snow-white, powdery at center with abundant conidia formation. Reverse side white at margin, yellowish at center.

¹ The composition of the inorganic nutrient medium: K_2HPO_4 , 0.3% ; NaCl , 0.05% ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{aq}$, 0.0025% ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2% ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{aq}$, 0.0003% .

Upper surface of colony unwettable, not submerged even by vigorous shaking, no appreciable growth when submerged in liquid phase. No guttation of liquid droplets; no odour; no soluble pigment produced.

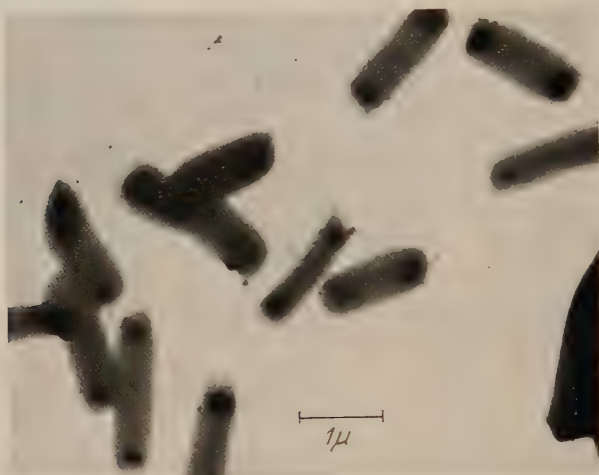


Fig. 6. Electron micrograph of conidia. (Inorganic nutrient solution; 30 days at room temperature)

Culture on glucose-salt-solution¹. Growth rapid. Colony irregularly twisted flakes with curved surface. Yellow; aerial hyphae scanty. Floating colonies easily submerged by shaking. No appreciable growth of submerged colonies, nor turbidity in liquid phase. Soluble yellow pigment produced in older cultures; no guttation of liquid droplets, no special odour.



Fig. 7. Photomicrograph of younger colonies initiating their growth on the slide glass wetted with the inorganic nutrient solution. (13 days; kept under moist condition; 25° C.)

Culture on peptone broth. Growth rapid. Colony as above; at first yellow to brownish yellow, later frost-white with abundant aerial hyphae and conidia. Readily submerged by shaking. No appreciable growth of submerged colonies, nor turbidity in liquid phase. Darkening of broth in very old cultures. No guttation of liquid drops; odour earthy, not very strong.

Culture on CZAPEK's agar (with no organic carbon source). Colony powdery and snow-white in appearance, much folded and raised, consisting of a tough mycelial felt; thicker at central area (up to 1.5—2 mm. in height) than at periphery. Reverse side wrinkled and pale yellowish. No pigment formation.

Culture on KRAINSKY's agar (with no carbohydrate). Colony much folded and raised (up to 1—2 mm. in height). Light yellowish at earlier stages of development,

¹ The composition of the glucose-salt-solution: Glucose (1%) added to the inorganic nutrient medium (see foot-note on page 61).

when vegetative hyphae predominate; later, colour changes to white at central area with development of aerial hyphae and conidia. Reverse side of colony wrinkled and pale yellowish.

Culture on calcium malate agar. Colony powdery in appearance, much folded and raised in central area (up to 0.5—1 mm. in height). Slightly cream-yellow at earlier stages of development; later, white with development of aerial hyphae and conidia. Reverse side of colony pale brownish.

Culture on broth-agar. Colony powdery and snow-white in appearance, much folded and raised (fig. 9). Reverse side relatively smooth and pale brownish.

In very old cultures, faint brown tint noticed in agar layer immediately beneath growing colony. Odour earthy, faint.



Fig. 8. Photograph of the colonies covering the surface of the inorganic nutrient solution. The total mass of the organism shown in this photograph weighed about 20 mg. in dry weight. (More than 6 months, at room temperature.)

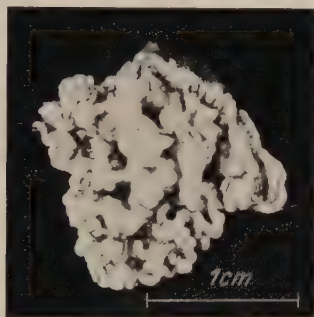


Fig. 9. Photograph of a colony. Broth agar plate. (14 days; 25° C.)

Culture on glucose-broth-agar. Colony same as above, but considerably thicker (up to 4 mm. in height).

Culture on malt-agar. Colony irregularly wrinkled and folded (up to 4 mm. in height); production of conidia rather poor. Reverse side wrinkled and pale yellowish.

Culture on milk. White and thin pellicles formed on milk surface. Reverse side yellowish. Milk not coagulated; no formation of soluble pigment.

Culture on litmus-milk. No coagulation of milk; no change in reaction.

Culture on glycerol-broth-agar. Growth scanty.

Culture on starch-agar. Growth scanty; starch not hydrolyzed.

Culture on potato plug. Colony white and much folded, with thick central area and thin periphery. Reverse side pale brownish.

Culture on carrot plug. Abundant growth forming white colonies which are much folded and thick (up to 3—5 mm. in height) at central area; periphery of colony thin and not folded. Reverse side pale cream-yellow. No soluble pigment formed.

Inorganic nitrogen sources. Given in a concentration of 0.1%, the following salts are utilized as nitrogen source: sodium nitrate, potassium nitrate, ammonium nitrate, ammonium chloride, ammonium phosphate and ammonium sulphate. Among these ammonium chloride and ammonium phosphate (ČAPEK'S

solution) gave the best results. The organism thrives also on urea as the sole nitrogen source. Atmospheric nitrogen is not utilized.

Other observations. Cellulose not decomposed; gelatin not liquefied; nitrate not reduced. Gram-positive; non acid-fast.

Habitat. Originally found on the surface of phosphate buffer solution left unused in a laboratory in Tokyo. Conceivably, it was derived from atmospheric dust.

Type-culture. The type-culture of the species will be preserved in the Japanese Type-Culture Collection, Nagao Institute, Tokyo, Japan.

Remarks

It should be remarked that, besides the organism described above, we have found at least three other strains of *Streptomyces* which can grow chemo-autotrophically. Isolation and identification of these organisms are now in progress. In view of these observations it was thought that facultative autotrophy might not be rare among the genus *Streptomyces*, and it was even surmised that the capacity might be shared by some other common forms of the same genus. Six common species of the genus (*Str. alni*, *Str. coelicolor*, *Str. griseus*, *Str. rubescens*, *Str. scabies*, and *Str. vinaceus*) were tested for their ability to grow autotrophically, but none of them gave a positive result.

Considering the fact that the autotrophic bacteria (including facultative autotrophs) are classified in a separate family, *Nitrobacteriaceae*, it would seem justified to propose a new family for the organism described above. Tentatively, however, it was classified as a *Streptomyces*, since, except for its capacity for facultative autotrophy, its features, both physiological and morphological, are entirely in accordance with the definition of the genus.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. H. TAMIYA, Director of the Tokugawa Institute for Biological Research, and Dr. K. KOMINAMI, Director of the Nagao Institute, for their interests and advices during the course of this study and for the review of the manuscript. The writers' thanks are also due to Dr. J. C. DAN of the Misaki Marine Biological Station for the infallible aids generously afforded in preparing electron micrographs. They gratefully acknowledge also the cooperation of Messrs. A. KITAHARA and K. NAKANO of Tokyo Institute of Technology, Laboratory of Electron Photography.

References

- BREED, R. S., E. G. D. MURRAY, and A. P. HITCHENS: *BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology*; 6th ed. Baltimore, 1948. — FRY, B. A., and J. L. PEEL (edit.): *Autotrophic Micro-organisms*. 4th Symposium of the Society for General Microbiology. Cambridge, 1954. — LEES, H.: *Biochemistry of Autotrophic Bacteria*. London, 1955. — WAKSMAN, S. A., and H. A. LECHEVALIER: *Guide to the Classification and Identification of the Actinomycetes and their Antibiotics*. New York, 1954.

(Aus dem Botanischen Institut der Universität München)

Zur Ernährungsweise und Physiologie von *Caulobacter*

Von

ANNEMARIE HUND* und OTTO KANDLER

Mit 15 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. März 1956)

Obwohl bereits JONES (1905) zweifellos Reinkulturen von *Caulobacter* besaß und auch OMELIANSKY (1914) und HENRICI u. JOHNSON (1935) diese Formen beobachteten, verdanken wir deren nähere Kenntnis erst elektronenmikroskopischen Beobachtungen. HOUWINK u. ITERSÖN (1950) fanden gestielte Bakterien als Verunreinigung elektronenmikroskopischer Präparate, und HOUWINK (1951) konnte sie dann auch in Reinkultur gewinnen und eingehender beschreiben (HOUWINK, 1955). Offenbar handelt es sich um ein recht häufiges, über die ganze Erde verbreitetes Bakterium, denn in den letzten Jahren erschienen weitere Mitteilungen aus verschiedensten Gegenden, in denen über das Vorkommen von *Caulobacter* berichtet wurde (BOWERS u. Mitarb., 1954; KANDLER u. Mitarb., 1954; BYSTRICKY, 1954; HOUWINK, 1952).

Von besonderem Interesse war die Beobachtung HOUWINKS, daß *Caulobacter* auf anderen Bakterien parasitiert. Allerdings ist diese Tatsache durch BOWERS u. Mitarb. (1954) wieder in Zweifel gezogen worden, da sie in mehreren Versuchen keinen Parasitismus beobachten konnten. Dabei handelte es sich jedoch nicht um den HOUWINKSchen, sondern um einen selbst isolierten Stamm, der allerdings morphologisch völlig identisch war. An diesem Stamm führten GRULA u. Mitarb. (1954) auch die ersten ernährungsphysiologischen Versuche aus und fanden, daß ihr Stamm in einer anorganischen Nährlösung bei Zusatz von Glucose und Riboflavin zu wachsen vermag. Weitere Untersuchungen über die Physiologie dieser merkwürdigen Bakteriengattung liegen bisher noch nicht vor.

In der vorliegenden Arbeit wurde besonders die Frage des Parasitismus erneut aufgegriffen und einige Versuche zur Kenntnis der Ernährungsansprüche und des Atmungsstoffwechsels ausgeführt.

* Die Arbeit ist ein Auszug aus der von Fräulein ANNEMARIE HUND bei der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München vorgelegten Dissertation gleichen Titels.

Material und Methode

Es wurde der von HOUWINK¹ isolierte Stamm, der nach BERGEYS MANUAL als *Caulobacter vibrioides* bezeichnet werden muß, benützt. Als Nährboden diente ein Hefeextrakt-Pepton-Agar folgender Zusammensetzung: 1,0% Pepton Merck, tryptisch verdaut aus Fleisch, 0,3% Cenovis-Hefeextrakt, 1% Agar, pH = 6,8. Für Massenkulturen wurde der gleiche Nährboden ohne Agar benützt. Die Bebrütungs-temperatur betrug 27° C.

Als Maß für den Zuwachs wurde die Trübung der Suspension (Extinktionsmessung mit dem Photometer) bzw. die Zunahme an Gesamtstickstoff verwendet. Die Stickstoffbestimmung erfolgte nach dem Mikro-Kjeldahl-Verfahren (vgl. KLEIN 1934).

Die üblichen bakteriologischen Nachweise verschiedener Stoffwechselleistungen wurden entsprechend den üblichen Vorschriften (vgl. HALLMANN 1953) ausgeführt.

Zur Atmungsmessung diente die manometrische Methode (vgl. DIXON 1951). Verwendet wurden kegelförmige Gefäße (Volumen rund 15 ml) mit einem Mitteleinsatz für das CO₂-Absorbens und 2 seitlichen Kippen für Substrate bzw. Gifte. Um genügende Mengen an Bakterien für die Atmungsmessungen zu erhalten, wurden Flüssigkeitskulturen bei 10000 g auf der Zentrifuge sedimentiert und die Bakterienmasse nach wiederholtem Auswaschen in entsprechend vermindertem Volumen aufgenommen.

Die Papierchromatographie wurde nach der absteigenden Methode (vgl. CRAMER 1953) ausgeführt. Als Lösungsmittel dienten: 1. Isopropanol 70%, Wasser 20%, Eisessig 10%. 2. α -Picolin 78%, Ammoniak 2%, Wasser 20%. Entwickelt wurde mit einer Lösung von 200 mg Ninhydrin in 100 ml Äthanol + 2 ml Wasser + einige Tropfen Eisessig.

Die mikroskopische Beobachtung erfolgte entweder mit dem Phasenkontrastverfahren, direkt in der Nährlösung oder an gefärbten Präparaten. Dabei wurde meist mit 2% Chromsäure fixiert und dann nach GIEMSA gefärbt. Zur Darstellung der Kernäquivalente wurde das Verfahren nach PIEKARSKY (1937) und ROBINOW (1949) (HCl-GIEMSA) verwendet. Im einzelnen wurde dabei wie folgt verfahren: Einige Tropfen einer jungen Bakteriensuspension werden auf eine abgetrocknete Agaroberfläche gegeben und nach dem Einsaugen der Flüssigkeit mit Dämpfen einer 1%igen Lösung von Osmiumtetroxyd 4–7 min fixiert. Dann schneidet man einen kleinen Block aus dem Agar heraus und legt ihn mit der Schichtseite auf ein Deckglas. Nach einigen Minuten wird der Agarblock abgeschleudert und das Deckglas kommt zum Trocknen mehrere Stunden in den Brutschrank (37° C). Anschließend erfolgt Hydrolyse durch Einlegen des Präparates in 1 n HCl bei 60° C für 5–15 min. Dann wird durch Einlegen in Pufferlösung (Phosphatpuffer von pH 7,2 gespült und 45–70 min mit GIEMSA-Lösung bei 37° C gefärbt (0,3 ml GIEMSA-Lösung auf 10 ml obigen Puffer). Zur mikroskopischen Betrachtung wird das Präparat in Pufferlösung oder Immersionsöl eingebettet. Es ist längere Zeit haltbar. Am günstigsten ist die sofortige Betrachtung, da die Klarheit des Präparates mit der Zeit nachläßt.

Die Mikrophotographien wurden mit Hilfe einer Winkel-Zeiß-Aufsetzkamera unter Verwendung von Silbereosinplatten hergestellt. Für Hellfeld wurde der Planochromat 100mal, A 1.25, für Phasenkontrast der Apochromat 100mal, A 1.32 von Zeiß verwendet.

Die Präparate für elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden in einfacher Weise durch Auftragen einer dünnen, ausgewaschenen Suspension auf die üblichen Zaponlackfolien hergestellt. In einigen Fällen erfolgte Bedampfung mit Titan-dioxyd oder Palladium.

¹ Herrn Dr. A. I. HOUWINK, Delft, sind wir für die Überlassung des Stammes zu großem Dank verpflichtet.

V Versuchsergebnisse

I. Morphologisch-cytologische Beobachtungen

Auf 1% Hefe-Pepton-Agar (HPA) bildet *Caulobacter vibrioides* kleine, kreisrunde Kolonien ohne besondere Gliederung; der Rand ist glatt. Mit zunehmendem Alter geht die Färbung von grau-weißlich in elfenbeinfarben über. Die Kolonien sind matt-glänzend. Auf Gelatine ist die Wuchsform verwaschener und der Kolonierand ist nicht mehr scharf ausgeprägt. Im Flüssigen entsteht eine homogene Trübung ohne ausgeprägte Kahlhautbildung.

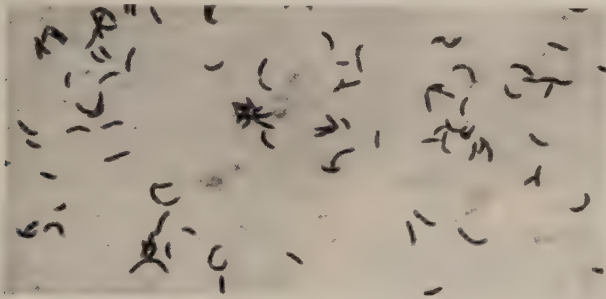


Abb. 1. Nach GIEMSA gefärbtes Präparat von *Caulobacter vibrioides* aus einer 24stündigen Kultur. Vergrößerung: 1000mal

In jungen Kulturen sind die Einzelorganismen von ziemlich einheitlicher Größe und färben sich nach GIEMSA weitgehend homogen an (Abb. 1). Im Phako ist der Stiel gerade noch sichtbar, ebenso in guten GIEMSA-Präparaten. Auf den Mikrophotographien kann er allerdings kaum dargestellt werden. Elektronenmikroskopisch ist er dagegen deutlich erkennbar. Die von HOUWINK (1955), BOWERS u. Mitarb. (1954) und GRULA u. HARTSELL (1954) gelieferten Beschreibungen können wir auf Grund unserer Beobachtungen im vollen Umfang bestätigen. Der Stiel ist zweifellos ein Auswuchs der Zelle (keine Abscheidung) und trägt am Ende eine Haftscheibe. Im Stiel sind je nach Länge ein bis mehrere „Querbalken“ in ziemlich regelmäßigen Abständen zu erkennen (Abb. 2)¹. Die jungen, beweglichen Organismen tragen eine endständige Geißel, die an einem kleinen Basalkorn inseriert ist (Abb. 2). Häufig findet man in den Zellen große dunkle Kugeln, die meist in der Zweizahl vorhanden sind (Abb. 2) und von GRULA u. HARTSELL (1954) als Metaphosphatanhäufungen angesprochen wurden. Sie treten besonders im Dunkelfeld (Abb. 6b) deutlich hervor.

¹ Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden im II. Physikalischen Institut der Universität München angefertigt. Herrn Dr. O. HUBER danken wir für seine Hilfe herzlich.

Da über die Kernverhältnisse von *Caulobacter* noch nichts bekannt ist, wurden auch HCl-GIEMSA-Färbungen durchgeführt. Im Gegensatz zu den meisten anderen Bakterien besitzt *Caulobacter* auch während der Hauptvermehrung nur ein Nucleoid, wie Abb. 3 deutlich zeigt. Neben

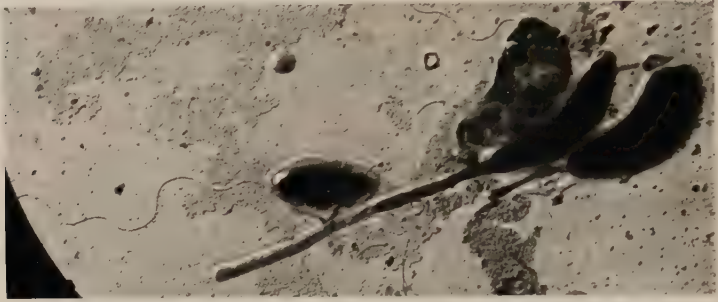


Abb. 2. Gestielte Zelle und Schwärmer von *Caulobacter vibrioides*. Im Stiel „Querbalken“. Schwärmer mit 2 Metaphosphatgranula und kleinem Geißel-Basalkorn. Elektronenoptisch. Gesamtvergrößerung 10000mal. Bedampfung mit Titandioxyd



Abb. 3. Darstellung der Kernäquivalente durch HCl-GIEMSA-Färbung bei *Bacillus cereus* (große Zellen) und *Caulobacter vibrioides* (kleine Zellen). Vergrößerung: 2000mal

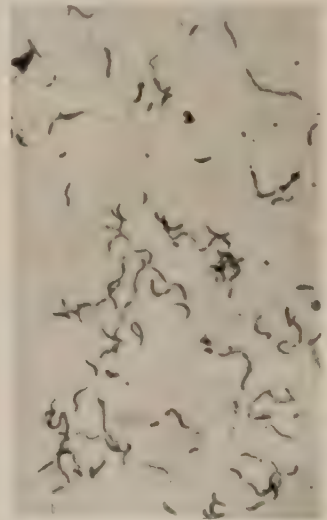


Abb. 4. Nach GIEMSA gefärbtes Präparat von *Caulobacter vibrioides* aus einer 8-tägigen Kultur. Vergrößerung: 1000mal

Caulobacter wurde vergleichsweise auch *Bacillus cereus* zugegeben, der als Wirtsbakterium diente und der deutlich binuclear ist. Nur bei Teilungsstadien von *Caulobacter* sind 2 gefärbte Zentren zu sehen. Die entsprechenden Stadien von *Bac. cereus* weisen aber dann 4 auf. Der Kern liegt bei *Caulobacter* genau zentral und ist damit deutlich von den subterminal gelegenen Metaphosphatgranula zu unterscheiden.

In älteren Kulturen treten vielfach Involutionsformen auf. Es handelt sich um teils sehr lange Zellen, die vermutlich als Ketten unvollständig abgegliederter Einzelorganismen angesehen werden können. Da die Krümmung der Einzelglieder immer abwechselnd um 180° verdreht ist, entstehen spirillenähnliche Gebilde (Abb. 4). Die GIEMSA-Färbung ist bei diesen Organismen nicht mehr so kräftig und vielfach innerhalb einer Zelle uneinheitlich. Dies beruht auf der inhomogenen Verteilung der Desoxy-Ribonucleinsäure in alternden Zellen. Auch diese Involutionsformen tragen am Ende noch häufig einen Rüssel (Abb. 5). Vorwiegend in Flüssigkeitskulturen tritt eine 2. Form der Degeneration auf. Die



Abb. 5. Typische „Langzelle“ mit Stiel aus einer 8 Tage alten Kultur. Elektronenoptisch. Gesamtvergrößerung: 3200mal

Zellen tragen am Ende, seltener auch in der Mitte, große blasenartige Ausstülpungen, die im Phako sehr kontrastarm sind und sich offenbar schwer fixieren lassen. Sie konnten nämlich immer nur am lebenden Objekt, aber nie in Präparaten gefunden werden.

Die sowohl von JONES (1905) als auch von HOUWINK (1955) und BOWERS u. Mitarb. (1954) beschriebene eigenartige Rosettenbildung war auch in unseren Kulturen sehr häufig.

II. Untersuchungen über die Ernährungsweise

Der wesentliche Grund, weshalb wir uns in vorliegender Arbeit mit *Caulobacter* beschäftigten, war weniger seine ungewöhnliche Form, als vielmehr die Tatsache, daß er auf anderen Bakterien festsitzend beobachtet worden ist (HOUWINK, 1951, 1955; KANDLER u. Mitarb., 1954) und vermutlich eine parasitische Lebensweise führt. Allerdings beweist die Möglichkeit der Reinkultur in Peptonwasser ohne „Futterbakterien“, daß es sich nur um einen fakultativen Parasitismus handeln kann.

a) Der Parasitismus

HOUWINK (1951, 1955) schloß aus 2 Beobachtungen, daß *Caulobacter* als Ektoparasit auf Bakterien lebt: 1. In Mischkulturen mit verschiedenen *Bacillus*-Arten war das Wachstum üppiger als in Reinkulturen; 2. Es wurden auf elektronenmikroskopischen Präparaten befallene Bacillen beobachtet, die teilweise bereits lysiert waren. Demgegenüber konnten BOWERS u. Mitarb. (1954) keine derartigen Beobachtungen machen. Da sich *Caulobacter* mit seinem Stiel auch an anderen Gegenständen, ja sogar

an dem Oberflächenhäutchen der Nährlösung festsetzt, war es denkbar, daß das Festhaften an anderen Bakterien keine besondere Bedeutung hat und nur zufällig auch einmal ein Trägerbakterium lysiert, wie es in normalen Kulturen immer wieder beobachtet werden kann. Daß sich *Caulobacter* nicht auf jeder Bakterienart festsetzt, spricht allerdings für eine innigere Beziehung, doch könnte das auch rein physikalische Gründe haben. Den sichersten Hinweis für die Existenz eines echten Parasitismus erbrachte HOUWINK (1955) mit der Beobachtung, daß die Keimzahl einer *Bacillus*-Suspension nach Zugabe von *Caulobacter* erheblich reduziert wurde, während sich *Caulobacter* stark vermehrte. Es wird allerdings darauf hingewiesen, daß *Caulobacter* möglicherweise auch schon durch freigesetzte Stoffe aus den Bacillen gefördert werden könnte und nicht direkt aufsitzen müßte. Ein Antibioticum wird von *Caulobacter* offenbar nicht produziert, wie Versuche von HOUWINK (1955) zeigten.

In eigenen Versuchen wurde beobachtet, daß bei Infektion von Nährböden, in denen *Caulobacter* nur sehr schlecht wuchs, mit Sarcinen (besonders *Sarcina lutea*), ein recht gutes Wachstum von *Caulobacter* einsetzte. Mikroskopisch waren allerdings nur sehr wenige befallene Sarcinen zu beobachten und man konnte daher vermuten, daß es sich in diesem Falle vorwiegend um die fördernde Wirkung von Stoffwechselprodukten der Sarcinen handelte. Es wurden daher Ammenkulturen verschiedener Modifikation ausgeführt. Benützt wurde ein Agarnährboden mit 0,1% Pepton, der nur sehr spärliches Wachstum von *Caulobacter* ermöglichte. Bei gemeinsamer Impfung mit *Sarcina* vermehrte sich *Caulobacter* jedoch sehr üppig. Legte man über die mit *Sarcina* bewachsene Platte eine sterile, bakteriendichte Folie und impfte darauf *Caulobacter*, so erfolgte kein Wachstum. Die Durchlässigkeit der Folie für die Nährstoffe war vorher durch die umgekehrte Versuchsanordnung, bei der *Sarcina* auf die Folie geimpft worden war und sich üppig vermehrte, erwiesen worden. Auch der unter die Folie geimpfte *Caulobacter* zeigte kein Wachstum. In einer 3. Variante wurde ein Nährboden mit der Folie bedeckt, diese mit Sarcinen beimpft und nach mehreren Tagen die Folie mit den Sarcinen abgenommen. Auf den nunmehr mit eventuellen Stoffwechselprodukten angereicherten Nährboden wurde *Caulobacter* aufgeimpft; wiederum ohne Erfolg. Demnach kann wohl eine Förderung durch Stoffwechselprodukte nicht die Ursache des beobachteten Phänomens sein, sondern es muß sich um einen engeren Kontakt beider Bakterien handeln.

Für die weiteren Versuche wurde zunächst ein Bakterienstamm ausgewählt, der besonders stark von *Caulobacter* befallen wird. Zu diesem Zweck mußten eine Reihe verschiedener Formen geprüft werden. Dies erfolgte in der Weise, daß Hefeextrakt-Pepton-Bouillon gleichzeitig mit *Caulobacter* und dem zu prüfenden Bakterienstamm beimpft und 24 Std

bebrütet wurde. Dann erfolgte die mikroskopische Kontrolle im Phako. Bei Verwendung folgender Bakterien konnte in keinem Falle ein Befall festgestellt werden: *Pseudomonas pyocyanea* und *alliicola*, *Flavobacterium breve* und 3 weitere Arten, *Achromobacter spec.* 5 verschiedene Stämme, *Alcaligenes recti*, *Serratia marcescens*, *Aerobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Corynebacterium michiganense*, *Actinomyces spec.*, *Nocardia spec.* 2 Stämme. Demgegenüber fanden sich bei folgenden Stämmen immer mehr oder weniger viele befallene Organismen: *Bacillus cereus*, 2 Stämme; *Bacillus mycoides*, *Bacillus spec.*, *Micrococcus aurantiacus* und *candidus*, *Sarcina aurantiaca* und *lutea*.

Die Zusammenstellung zeigt, daß keiner der geprüften gramnegativen Stämme befallen wurde, während die grampositiven, mit Ausnahme der Angehörigen der *Actinomycetales*, als Wirt geeignet waren.

Besonders reichlich war der Befall bei *Bac. cereus*, der deshalb bei allen weiteren Versuchen verwendet wurde. Abb. 6a u. b geben das typische Bild befallener Bacillen, wie es sich im Phasenkontrast und Dunkelfeld zeigt. Entsprechend der geringen Tiefenschärfe der Immersion ist nur bei der am Ende der Kette ansitzenden *Caulobacter*-Zelle der Stiel

zu erkennen. Wie schon HOUWINK betonte, verlieren die befallenen Bacillen zunächst ihre Beweglichkeit nicht. Man kann häufig beobachten, wie in rascher Bewegung begriffene Zellen die aufsitzenden *Caulobacter* mit sich schleppen. Die Verbindung muß sehr fest sein, denn man kann nur sehr selten das Ablösen des Parasiten beobachten.

In einigen Versuchen wurden die Bedingungen, die das Festsetzen von *Caulobacter* beeinflussen, untersucht. Dazu war es zunächst wichtig zu wissen, wie rasch der Befall vor sich geht. Es wurden zu diesem Zweck Suspensionen von *Caulobacter* und *Bac. cereus* gemischt (*Caulobacter*-Überschuß) und auf der Schüttelmaschine inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden die Proben entnommen und im Mikroskop durch Auszählen von 400 Bacillen der Prozentsatz der befallenen Bacillen festgestellt. Abb. 7 zeigt das Ergebnis. Sowohl bei Verwendung von 12 als auch von 36 Std alten *Caulobacter* ist nach etwa 2 Std der maximale

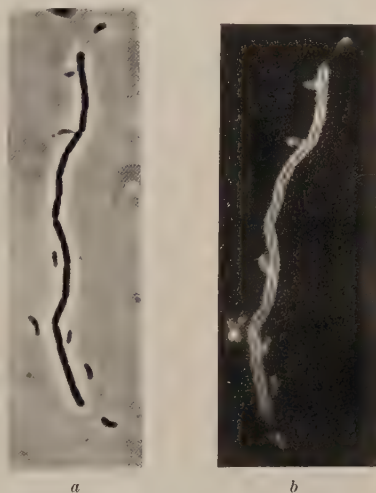


Abb. 6. Kette von *Bacillus cereus* von mehreren *Caulobacter* befallen. Nur bei der Zelle am rechten Ende der Kette ist der Stiel sichtbar.
a Phasenkontrast-, b Dunkelfeld-Aufnahme.
Vergrößerung: 1000mal

Befall erreicht und die Kurven steigen nur noch geringfügig weiter an. Bei den weiteren Versuchen wurde daher immer nach 3 Std ausgezählt.

Um die Frage zu klären, welcher Prozentsatz einer *Caulobacter*- bzw. Bacillensuspension überhaupt befallfähig ist, wurden verschiedene Mischungsverhältnisse beider Formen hergestellt und wiederum der

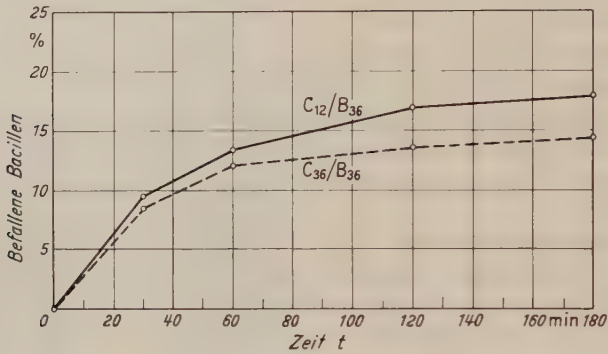


Abb. 7. Abhängigkeit des Prozentsatzes der befallenen Bacillen von der Inkubationsdauer

Prozentsatz der befallenen Bacillen, bzw. der haftenden *Caulobacter* nach 3 Std ausgezählt. Abb. 8 veranschaulicht das Ergebnis. Bei 10fachem Überschuß von *Caulobacter* wurden knapp 40% der Bacillen befallen, bei entsprechendem Überschuß von Bacillen hafteten rund 30% der *Caulobacter*. Eine weitere Verschiebung auf 1:30 brachte keine wesentliche Veränderung mehr. Der Versuch zeigt, daß immer nur ein gewisser

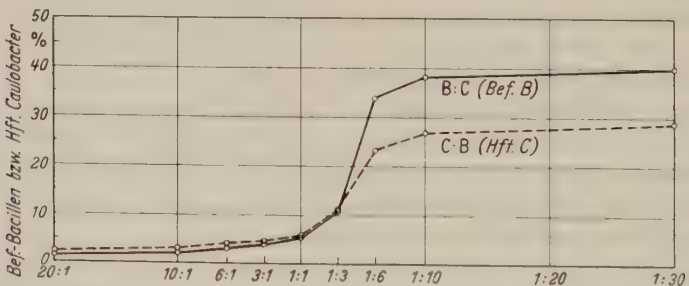


Abb. 8. Prozentsatz der befallenen Bacillen bzw. haftenden *Caulobacter* in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis Bacillen/*Caulobacter*, bzw. *Caulobacter*/Bacillen. Beide Bakterien 36 Std alt

Teil der Organismen befallfähig ist und daß ein Mischungsverhältnis 1:10 den maximalen Befall mit guter Annäherung liefert.

Inwieweit der Anteil der „aktiven“ *Caulobacter* einer Suspension vom Entwicklungszustand abhängt, wurde in Versuchen geklärt, in denen aus verschieden alten *Caulobacter*-Kulturen eine gewisse Menge zu einem

10fachen Überschuß von stets 36 Std alten Bacillen gegeben wurde. Zur Charakterisierung des Zustandes der *Caulobacter*-Kultur wurde bei jeder Probeentnahme auch die Extinktion der Suspension als ungefähres Maß für die Keimzahl gemessen. Wie aus der Tab. 1 hervorgeht, ergibt sich bei 18—24 Std alten Kulturen, wenn die stationäre Phase allmählich einsetzt, die größte Befallfreudigkeit.

In jüngeren Kulturen ist der Prozentsatz der sich sofort festsetzenden *Caulobacter* geringer, weil ein Großteil noch keinen Stiel ausgebildet hat. Wie die Lebendbeobachtungen im Phasenkontrast zeigten, erfolgt das Festsetzen erst, wenn der Stiel

entwickelt ist und nicht umkehrt, wie HOUWINK (1951) annimmt. Der Rückgang der Haftfähigkeit in älteren Kulturen, in denen praktisch alle Zellen einen Stiel entwickelt haben, beruht wohl auf einer Veränderung der Haftscheibe mit der Alterung. Innerhalb des Entwicklungsablaufes des Einzelbakteriums scheint die Zeit nach Beendigung der Schwärmperiode und der Aus-

bildung des Stieles, wenn die Vorbereitung zur neuen Zellteilung einsetzt, der Zeitpunkt der größten Befallfreudigkeit zu sein. Die Ausbildung des Stieles scheint zum normalen Entwicklungsablauf zu gehören und ist nicht von einer äußeren Induktion, z. B. chemische oder mechanische Reize durch Wirtsbakterien oder Berühren einer Oberfläche, abhängig. Es wurden niemals Teilungsstadien von Schwärmern beobachtet, sondern in allen Fällen war die eine Zelle bereits gestielt.

Weiterhin wurde geprüft, in welchem Zustand die Bacillen für den Befall am geeignetsten sind. Dazu wurden 12 Std alte (log-Phase) und 36 Std alte (stationäre Phase) Kulturen von *Bac. cereus* mit dem 10fachen Überschuß von *Caulobacter* versetzt. Es zeigte sich, daß von den 12 Std alten Kulturen rund 70%, von den 36 Std alten Kulturen nur 40% befallen wurden. Mit zunehmendem Alter werden demnach die Bacillen für *Caulobacter* unangreifbar.

Alle bisherigen Versuche wurden in normalem Hefeextrakt-Pepton-Wasser ausgeführt, und es war naheliegend, daß in Medien, die für *Caulobacter* weniger günstige Wachstumsbedingungen bieten, die Befallfreudigkeit gesteigert werden kann. Deshalb wurden Suspensionen von *Caulobacter* und *Bac. cereus* abzentrifugiert, auf der Zentrifuge gewaschen und dann in verschiedenen Mengenverhältnissen in Aqua dest., bzw. in Hefeextrakt-Pepton-Wasser suspendiert. Gegenüber Aqua dest. war die Zahl

Tabelle 1. Abhängigkeit des Prozentsatzes haftender *Caulobacter* vom Alter der *Caulobacter*kulturen

Alter der <i>Caulobacter</i> -Kultur in Stunden	Haftende <i>Caulobacter</i> in Prozent	Extinktion
12	25	15
18	35	22
24	34	25
36	28,5	25
48	26	25

der befallenen *Bac. cereus* in letzterem um ein Fünftel, die Zahl der haftenden *Caulobacter* um ein Drittel geringer. Dieser Effekt mußte aber nicht ausschließlich auf der geringeren Substratversorgung beruhen (für *Bac. cereus* war dies an sich unwahrscheinlich), sondern konnte auch osmotisch bedingt sein. Es wurden daher entsprechende Versuche angesetzt, in denen verschiedene Konzentrationen von NaCl bzw. Mannit (um spezifische Ioneneffekte zu eliminieren) in ihrer Wirkung auf die Befallhäufigkeit untersucht wurden. Tab. 2 zeigt das Ergebnis. Tatsächlich wird der Prozentsatz der befallenen Bacillen mit steigendem osmotischen Wert der Lösung erheblich reduziert. Dabei ist NaCl deutlich wirksamer als Mannit. Dies mag darauf beruhen, daß die geladenen Elektrolyte noch zusätzliche Veränderungen der Schleimhüllen der Bacillen bewirken.

Durch kryoskopische Bestimmung war der osmotische Wert des Hefeextrakt-Pepton-Wasser zu 2,5 Atm. ermittelt worden. Berechnet man mit Hilfe der Werte der Tab. 2 die Verminderung der befallenen Bacillen für diesen Wert, so bekommt man mit guter Annäherung die experimentell gefundene Verminderung um rund ein Fünftel. Der Rückgang der befallenen Bacillen kann demnach auf die osmotisch bedingten Veränderungen der Zellmembran bzw. Schleimhülle zurückgeführt werden.

Tabelle 2. Abhängigkeit der Befallhäufigkeit vom osmotischen Wert der Suspensionsflüssigkeit. Beide Bakterien aus 36 Std alten Kulturen.

Osmoticum	Osmotischer Wert in Atm.	Befallene Bacillen %	Haftende <i>Caulobacter</i> %
Mannit	—	48,0	30,0
	4,7	37,8	22,8
	18,7	27,7	15,9
	37,7	21,2	13,7
NaCl	3,7	36,0	25,0
	10,8	26,0	17,0
	21,7	17,0	13,5

Auch die Zahl der haftenden *Caulobacter* wird durch steigende osmotische Werte der Suspensionsflüssigkeit vermindert. Allerdings ergibt sich dabei zwischen der Verwendung von NaCl und Mannit als Osmoticum kein so deutlicher Unterschied. Der Effekt ist auch erheblich geringer als bei Verwendung von Hefeextrakt-Pepton-Wasser, wenn man wiederum auf die 2,5 Atm. desselben interpoliert. Der erwartete, osmotisch bedingte Rückgang würde dann nur rund ein Achtel betragen, während experimentell ein Drittel gefunden wurde. Die Differenz kann als Ausdruck der „Substratwirkung“ aufgefaßt werden.

Wenn auch die bisher geschilderten Versuche eindeutig zeigen, daß das Festsetzen von *Caulobacter* auf Bacillen kein zufälliger Vorgang ist, sondern regelmäßig reproduziert werden kann und gewissen Gesetzmäßig-

keiten unterliegt, so stellen sie doch keinen direkten Beweis dafür dar, daß es sich um einen Parasitismus handelt. Dieser konnte nur durch Mikrokulturen erbracht werden, in denen die Schädigung der Bacillen durch ansitzende *Caulobacter* bei fortlaufenden Beobachtungen festgestellt werden kann. Zu diesem Zweck wurden auf sterilen Objektträgern dünne Agarschichten (Hefeextrakt-Pepton-Agar) gegossen, mit einer Mischung *Caulobacter*/*Bac. cereus* beimpft, mit einem sterilen Deckglas bedeckt und dann mit Paraffin umrandet. Im Phako wurde dann eine Stelle eingestellt, wo neben mehreren unbefallenen Bacillen auch ein



Abb. 9 a—c. Fortlaufende Phako-Aufnahmen einer Mikrokultur mit befallenem *Bacillus*. Beobachtungszeit bis zur Lyse 3 Std. Vergrößerung: 1000mal

eindeutig befallener lag. Im Laufe der nächsten Stunden erfolgte dann mittels eines Okularmikrometers die Längenmessung sowohl mehrerer unbefallener als auch der befallenen Bacillen. Die Auswertung von rund 20 derartigen Mikrokulturen ergab folgendes Bild: Von den beobachteten nicht befallenen Bacillen zeigten 92,3% Zuwachs, von den befallenen nur 20%. Aber auch die trotz des Befalles wachsenden Bacillen waren deutlich gehemmt, denn der mittlere Zuwachs der unbefallenen, wachsenden Bacillen betrug 312%, der der wachsenden befallenen dagegen nur 155%. In 24% der Fälle lysierten nach einigen Stunden die befallenen Bacillen. Von den nicht befallenen und nicht wachsenden dagegen waren es nur 2,3%. Diese Zahlen beweisen, daß die Bacillen tatsächlich von den ansitzenden *Caulobacter* geschädigt werden. Die Abb. 9 a—c veranschaulicht diesen Sachverhalt. Es sind Aufnahmen einer der typischen Mikrokulturen, aus denen die obigen Zahlen gewonnen wurden. In diesem Falle führt der Befall zur Lyse des *Bacillus*.

b) Saprophytische Ernährung

Auf den meisten der üblichen bakteriologischen Nährböden wächst *Caulobacter* nicht oder nur sehr schlecht. Nach den Erfahrungen von HOUWINK ist Peptonwasser ein geeigneter Nährboden. Wir prüften verschiedene Peptone („Witte“, Merck Nr. 7214 — tryptisch verdaut aus

Fleisch —, Merck Nr. 7213 — tryptisch verdaut aus Casein —, Pepton aus Hefe) und fanden das durch tryptische Verdauung aus Fleisch hergestellte Präparat von Merck Nr. 7214 als am besten geeignet. Bei Konzentrationsstufungen von 0,1—2,0% ergab sich kein Optimum, sondern mit steigender Peptonkonzentration stieg auch der Zuwachs an.

Tabelle 3. Wirkung von Vitaminzusätzen zu 1,0% Peptonwasser

Nährboden + Zusatz	Konzentration des Zusatzes mg/ml	N-Menge in %	Extinktion
1,0% Peptonwasser . . .	—	520	39,0
p-Aminobenzoessäure . . .	10 ⁻⁴	387	33,0
	10 ⁻⁶	720	49,0
B ₁ (Aneurin)	10 ⁻⁴	740	50,0
	10 ⁻⁶	670	48,0
B ₆	10 ⁻⁴	670	48,0
	10 ⁻⁶	575	42,0
Folsäure	10 ⁻⁴	590	44,0
	10 ⁻⁶	650	47,0
Nicotinsäure	10 ⁻⁴	760	51,0
	10 ⁻⁶	630	45,0
Pantothensäure	10 ⁻⁴	760	51,0
	10 ⁻⁶	775	53,0
Riboflavin	10 ⁻⁴	485	37,0
	10 ⁻⁶	850	58,5
Multibionta	10 ⁻⁴	835	57,0
	10 ⁻⁶	880	60,5
HPW (1% Pepton, 0,3% Hefeextrakt)		1500	95,5

Einen außerordentlich starken Mehrzuwachs ergaben Zusätze von Hefeextrakt (Cenovis). Optimal waren Konzentrationen von 0,3—1,0%, wenn man Hefeextrakt alleine verwendete. Höhere Konzentrationen hemmten. In Kombination mit Pepton erwies sich die eingangs erwähnte Mischung, die als Standardnährboden für alle weiteren Versuche verwendet wurde, als optimal. Gegenüber einer 1%igen Peptonlösung bewirkte der Zusatz von 0,3% Hefeextrakt eine Wachstumssteigerung von 300%. In weiteren Ansätzen wurde versucht, ob man derartig günstige Wachstumsleistungen auch durch Zusätze definierter Substanzen erzielen kann. Zunächst wurden einige Kohlenhydrate in Konzentrationen von 0,1% den 1%igen Peptonlösungen zugesetzt, aber es ergab sich keine Steigerung gegenüber den Kontrollen.

Als nächstes wurden verschiedene Vitamine erprobt. Tab. 3 gibt einen Überblick über die Ergebnisse. Praktisch wirken alle geprüften Vitamine fördernd, wobei sich Riboflavin als bestes erweist. Die Kombination aller

einzelnen Substanzen, wie sie in dem käuflichen Präparat „Multibionta“ vorliegt, führt aber nicht zu einer auch nur annähernden Summierung der Förderung, sondern ergibt nur Werte, wie sie Riboflavin alleine ebenfalls hervorbringt. Die günstige Wirkung von Riboflavin auf *Caulobacter* haben auch GRULA u. Mitarb. (1954) bereits hervorgehoben. Gegenüber der Wirkung von Hefeextrakt bleibt allerdings auch Riboflavin weit zurück.

GRULA u. Mitarb. (1954) war es gelungen, *Caulobacter* auch in einer völlig anorganischen Nährlösung, die als Kohlenstoffquelle nur Glucose und als Vitamin lediglich Riboflavin enthielt, zu kultivieren. Wir wiederholten die Ansätze in genau der gleichen Art, konnten aber mit unserem Stamm kein Wachstum erzielen. Auch kleinere Variationen in der Nährbodenzusammensetzung hatten keinen Erfolg. Trotz der großen morphologischen Ähnlichkeit der beiden Stämme, scheinen doch grundsätzliche physiologische Unterschiede zu bestehen, wie auch die Tatsache andeutet, daß GRULA u. Mitarb. keinen Parasitismus beobachten konnten.

Bessere Übereinstimmung ergab sich dagegen bei den Ergebnissen über Temperatur und pH-Optima. Sie lagen bei unserem Stamm bei pH 6,5—7,2 bzw. bei einer Temperatur von 27° C, also ganz ähnlich wie die des Stammes der oben erwähnten Autoren.

Abschließend kann gesagt werden, daß unser *Caulobacter*-Stamm zwar sehr gut saprophytisch wächst, aber große Anforderungen an das Substrat stellt und vermutlich Vitamin-heterotroph ist. Die günstige Wirkung des Hefeextraktes konnte durch keine definierten Zusätze erreicht werden.

III. Stoffwechselphysiologische Untersuchungen

a) Nachweis bakteriologisch-diagnostisch wichtiger Leistungen

Zur Vervollständigung der Beschreibung und Charakterisierung von *Caulobacter* wurden die üblichen Reaktionen ausgeführt.

Kohlenhydratvergärung. Das normale HPW wurde mit 1% des betreffenden Zuckers und 0,1% Bromthymolblau versetzt. Der Umschlag zu farblos würde die Säurebildung anzeigen. Bei allen folgenden Zuckern wurde keine Säure gebildet, sondern ein allmählicher Umschlag nach blau (alkalisch) beobachtet: Arabinose, Fructose, Glucose, Lactose, Mannose, Maltose, Rhamnose, Saccharose, Stärke, Xylose.

Nitratreduktion. In HPW + 1% Nitrat wurde nach 48 Std Bebrütung auf Nitrit geprüft. Die Reaktion war positiv. Ammoniak wurde jedoch nicht gebildet. Dieser Befund steht im Gegensatz zu dem von BOWERS u. Mitarb. (1954), deren Stamm kein Nitrat reduzierte.

H₂S-Bildung. Nachweis im HPW bei Zusatz von 0,1% Natriumthiosulfat mit Bleiacetatpapier war negativ.

Harnstoffspaltung. Zusatz von 1% Harnstoff zu HPW nach dem Sterilisieren. Nach 48 Std ließ sich keine Alkalisierung durch NH₃ nachweisen.

Indolbildung. HPW wurde mit Tryptophan (0,1%) angereichert. Der Indol-nachweis mit p-Dimethylaminobenzaldehyd blieb trotz guten Bakterienwachstums negativ.

Acetyl-methyl-carbinol-Bildung. (VOGES-PROSKAUER-Reaktion) HPW wurde mit 0,1% Glucose versetzt. Nach 48 Std wurde durch Zusatz von 1 ml 10% KOH im UV auf Acetyl-methyl-carbinol geprüft. Der Test verlief negativ.

Katalase. Der Nachweis mit Hilfe von 10% H_2O_2 verlief negativ.

Caulobacter zeichnet sich demnach durchwegs durch negative Merkmale aus.

b) Verwertbarkeit verschiedener Substrate im Atmungsstoffwechsel

Einige orientierende Versuche zeigten, daß *Caulobacter* einen sehr kräftigen oxydativen Stoffwechsel besitzt. Besonders Pepton bewirkt eine rasche Sauerstoffaufnahme. Zur Messung des Atmungsstoffwechsels wurde die manometrische Methode benützt. Um die Verwertbarkeit der verschiedenen Substrate im Atmungsstoffwechsel quantitativ darstellen zu können, waren zunächst einige methodische Vorversuche notwendig.

Als erstes wurde die Abhängigkeit der Atmungsintensität vom Alter der Kulturen untersucht. Dazu wurde 1 l HPW angeimpft und auf der Schüttelmaschine bebrütet, damit für alle Zellen eine möglichst gleichmäßige O_2 - und Substratversorgung gewährleistet war. In etwa 12stündigen Intervallen wurden Proben entnommen, auf der Zentrifuge gewaschen und die Bakterienmasse in m/45 Phosphatpuffer p_H 7,0 suspendiert. Je 3 ml wurden in die Atmungströge gegeben und sowohl Leer- als auch Peptonatmung gemessen. Es zeigte sich, daß die Leeratmung bei den jungen, bis zu 24 Std alten Kulturen hoch und die durch Pepton bewirkte Steigerung relativ gering war. Bei den 36–48 Std alten Kulturen war die Leeratmung deutlich geringer und die Peptonatmung erreichte bei diesen das Maximum. Bei späteren Versuchen wurden daher immer 36stündige Kulturen verwendet.

Als nächstes wurde der Einfluß der Puffermolarität untersucht. Bis zu m/8 (Phosphatpuffer p_H 7,0) traten starke Hemmungen auf, während die schwächeren Konzentrationen m/16 – m/64 keine signifikanten Unterschiede zeigten.

Weiterhin mußte auch der Einfluß des p_H -Wertes untersucht werden. Wie Abb. 10 zeigt, ist der Bereich von p_H 5,0–7,0 praktisch gleich günstig, während die alkalischen Proben (p_H 8,0 und 9,0) deutlich geringere Atmungsgeschwindigkeit aufweisen. Diese Beobachtung stimmt auch mit den Befunden bei den entsprechenden Wachstumsversuchen überein.

Da bei der Vorbereitung des Materials ein mehr oder weniger langer Aufenthalt der Bakterien in dest. Wasser oder Puffer unumgänglich war, dabei aber bereits eine Schädigung eintreten konnte, wurde auch noch geprüft, ob der Atmungsanstieg nach längerer Verarmung noch gleich war wie kurz nach dem Zentrifugieren. Dazu wurden mehrere Atmungströge mit gleichen Suspensionen gefüllt und nach verschiedenen Zeiten aus dem seitlichen Kipper das Substrat (Pepton) zugegeben. Es zeigte sich, daß etwa 120 min Verarmung ohne Schädigung ertragen werden. Erst nach 240 min verringerte sich der Anstieg des Sauerstoffverbrauches nach Peptonzugabe. Da die normalen Vorbereitungszeiten im allgemeinen 1 Std nicht überschritten, war keine Beeinträchtigung der Atmungsmessungen zu befürchten.

Auf Grund der Ergebnisse dieser Vorversuche wurde bei allen folgenden Versuchen m/15 Phosphatpuffer pH 6,8 verwendet. In allen Fällen wurde der Gesamtstickstoff der Suspensionen bestimmt und eine Probe mit Pepton als Standardprobe mitgeführt. Damit konnte der Sauerstoffverbrauch immer auf Gesamtstickstoff bezogen werden, und durch Beziehen auf die „Peptonatmung“ wurden Aktivitätsschwankungen des Materials ausgeglichen.

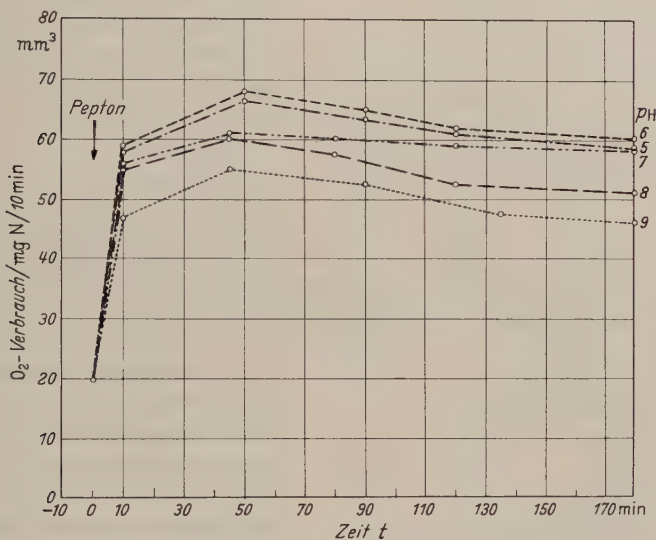


Abb. 10. Abhängigkeit der Atmungsgeschwindigkeit vom pH

1. Kohlenhydrate

Zu je 2 ml Bakteriensuspension (entsprechend den oben angeführten Bedingungen) je Atmungsstrog wurden nach Bestimmung der „Ausgangs-atmung“ (Sauerstoffverbrauch ohne Substrat in der 1. Std) aus dem seitlichen Kipper Lösungen verschiedener Kohlenhydrate zugegeben, so daß die Endkonzentration $3 \cdot 10^{-1}$ m (etwa 0,5%) betrug. Während bei der Probe ohne Zusatz die Atmung weiterhin langsam abfiel, stieg sie bei den einzelnen Zusätzen mehr oder weniger stark an oder zeigte einen verminderten Abfall. Abb. 11a u. b geben einen typischen Versuch wieder, bei dem alle Kohlenhydrate in einem Ansatz, also an gleichen Suspensionen, untersucht wurden. Der Sauerstoffverbrauch ist in Prozent der Ausgangsatmung, die als 100% gesetzt wurde, wiedergegeben.

Zu einem wirklich deutlichen Anstieg des O₂-Verbrauches führten nur Cellobiose, Maltose und Stärke, während alle anderen Zucker nur maximale Steigerungen der Ausgangsatmung um rund 25% bewirkten.

Bedenkt man, daß Pepton zu einer 300%igen Steigerung führt, so wird deutlich, daß die Kohlenhydrate keine große Bedeutung für den Atmungsstoffwechsel von *Caulobacter* haben. Die günstige Verwertung der Di- und Polysaccharide steht vielleicht im Zusammenhang mit der Fähigkeit, die Schleimschicht und Membran von Bacillen, die zu einem

wesentlichen Teil Polysaccharide enthalten, zu durchstoßen. Dies kann sicherlich nicht auf rein mechanische Weise, sondern nur mit entsprechenden Glykosidbindungen spaltenden Fermenten bewerkstelligt werden.

Für Glucose und Maltose wurde auch der $RQ(CO_2/O_2)$ bestimmt. Er betrug für ein Intervall von 2 Std 0,95. Für die Leeratmung wurde im gleichen Zeitraum ein RQ von 1,1—1,2 gemessen. Bringt man von dem Gesamt- O_2 -Verbrauch, bzw. der CO_2 -Produktion der Probe mit Glucose bzw. Maltose den Verbrauch der Leeratmung in Abzug und berechnet den RQ nur aus der Differenz des O_2 -Verbrauches bzw. der CO_2 -Produktion, die durch den Zusatz der Kohlenhydrate bedingt ist, so ergibt sich ein Wert von ungefähr 0,1. Daraus geht hervor, daß es sich wohl nur um eine Oxydation der Kohlenhydrate ohne CO_2 -Abspaltung handelt. Wenn trotzdem mit der üblichen bakteriologischen Methode keine Säurebildung

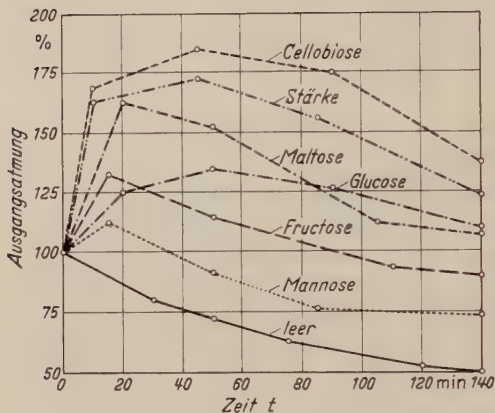


Abb. 11 a

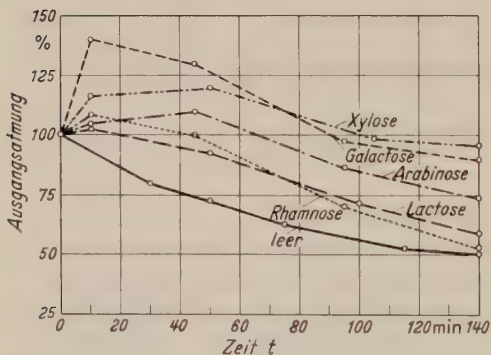


Abb. 11 b

Abb. 11 a und b. Sauerstoffverbrauch nach Zugabe verschiedener Kohlenhydrate in Prozent der Ausgangsatmung (Sauerstoffverbrauch in den ersten 60 min ohne Substrat). $t = 27^\circ C$

nachgewiesen werden konnte, so beruht dies darauf, daß *Caulobacter* aus dem Pepton des Nährbodens alkalische Verbindungen (vermutlich Amine) bildet, die die an sich geringe Säurebildung überkompensieren und auch bei Anwesenheit von Kohlenhydraten zu einer Alkalisierung des Nährbodens führen.

2. Alkohole

In ganz entsprechender Weise wie die Kohlenhydrate wurden auch die Alkohole Methanol, Äthanol und Glycerin auf ihre Verwertbarkeit geprüft. Wie Abb. 12 zeigt, führen sie nur zu einem sehr kurzfristigen Atmungsanstieg, der rasch wieder zurückgeht. Bezieht man den O_2 -Verbrauch auf die Peptonatmung der gleichen Probe, so zeigt sich, daß selbst das anfängliche Maximum noch unter den Förderungswerten der Kohlenhydrate zurückbleibt (Tab. 6).

3. Niedere Carbonsäuren

Bekanntlich spielen niedere Carbonsäuren beim Abbau verschiedener Substrate über den Citronensäurecyclus eine große Rolle und sehr viele Bakterien können organische Säuren mit großer Geschwindigkeit umsetzen. Wie Abb. 13a u. b zeigen, ist dies bei *Caulobacter* nur in geringem Umfange der Fall. Lediglich Brenztrauben-, Fumar- und Bernsteinsäure werden längere Zeit mit annähernd konstanter Geschwindigkeit oxydiert. Alle anderen Säuren führen dagegen nur zu einem anfänglichen Atmungsanstieg. Der Abfall setzt zu einem Zeitpunkt ein, zu dem sicherlich noch kein vollständiger Verbrauch des Substrates eingetreten ist. Da die Umsatzgeschwindigkeit der Säuren bekanntlich eine starke

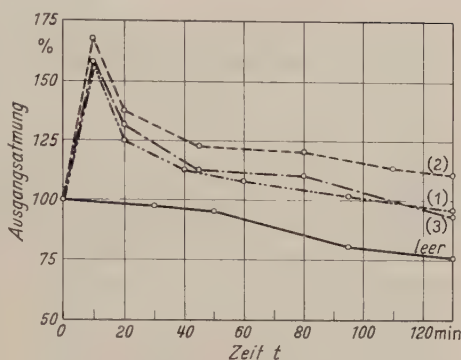


Abb. 12. Sauerstoffverbrauch nach Zugabe verschiedener Alkohole in Prozent der Ausgangsatmung. $t = 27^\circ \text{C}$

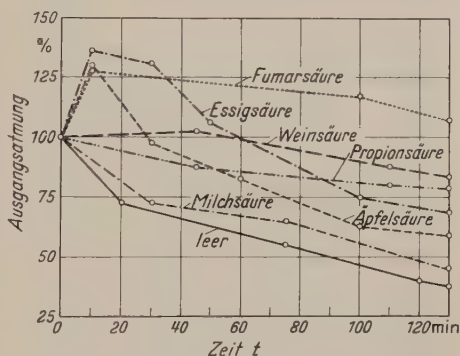


Abb. 13a

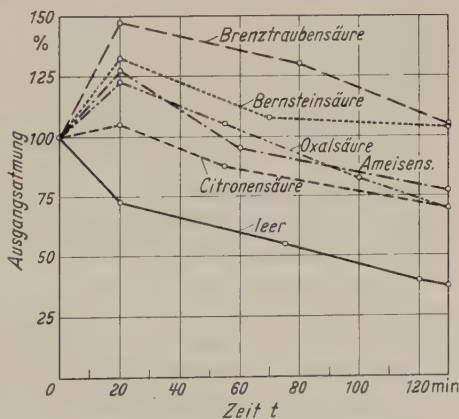


Abb. 13b

Abb. 13a und b. Sauerstoffverbrauch nach Zugabe verschiedener niederer Carbonsäuren in Prozent der Ausgangsatmung. $t = 27^\circ \text{C}$

Konzentrationsabhängigkeit zeigt, wurden mehrere Konzentrationen zwischen $m/1000$ und $m/10$ benützt und nur die Beispiele mit bestem Umsatz wiedergegeben.

4. Aminosäuren und Pepton

Wie bereits erwähnt, bewirkt Pepton maximale Atmungssteigerung und ist auch für das Wachstum von *Caulobacter* ausreichend. Der RQ

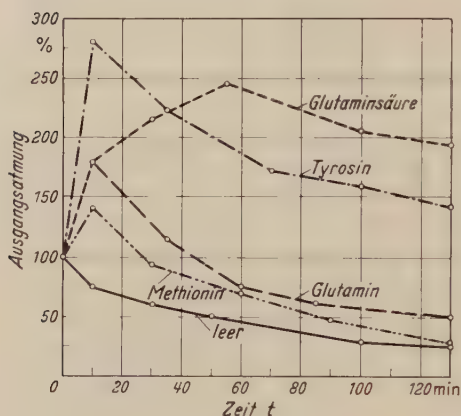


Abb. 14a

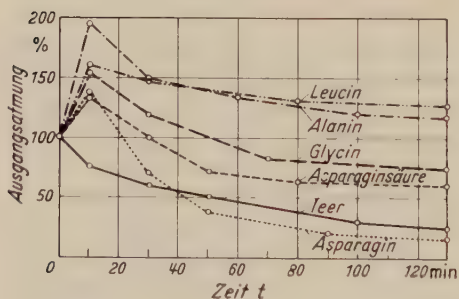


Abb. 14b

Abb. 14a und b. Sauerstoffaufnahme nach Zugabe verschiedener Aminosäuren in Prozent der Ausgangsatmung. $t = 27^\circ \text{C}$

der Peptonatmung wurde zu 1,2—1,3 bestimmt und liegt damit erheblich über dem theoretischen Wert, der ungefähr 0,85 beträgt. Die RQ-Erhöhung erklärt sich aus der starken Bildung von Aminen durch Decarboxylierung von Aminosäuren, wodurch auch die Alkalisierung der Nährböden bewirkt wird.

Entsprechend der guten Verwertbarkeit von Pepton, werden auch verschiedene einzelne Aminosäuren sehr rasch umgesetzt, wie Abb. 14a und b zeigen. Allerdings wird die durch Pepton bewirkte maximale Atmungssteigerung durch keine Aminosäure ganz erreicht. Lediglich in den ersten Minuten führt Tyrosin zu entsprechend hohen Werten, die aber dann stark abfallen. Auffällig ist der Unterschied zwischen der guten Verwertung von Glutaminsäure bzw. Asparaginsäure und der schlechten der zugehörigen Amide Glutamin bzw. Asparagin.

Offenbar kann die Amidbindung von *Caulobacter* nicht gespalten werden. Der Anstieg in den ersten Minuten dürfte auf der stets vorhandenen und chromatographisch leicht nachweisbaren Verunreinigung der Amide durch die freien Säuren beruhen.

Für die beste umgesetzte Aminosäure, Glutaminsäure, wurde auch der RQ bestimmt. Er beträgt 1,12 und entspricht damit dem theoretischen Wert, wenn man einen Abbau zu CO_2 , Wasser und NH_3 annimmt.

Weiterhin wurde festgestellt, welcher Anteil der zugesetzten Glutaminsäure vollkommen veratmet und wieviel von den Zellen eingebaut worden ist. Zu diesem Zweck wurde eine bestimmte Menge Glutaminsäure zugegeben und die Atmung bis zum Abfall der Atmungsintensität gemessen. Die papierchromatographische Untersuchung der Lösung ergab, daß zum Zeitpunkt des Atmungsabfalles tatsächlich keine Glutaminsäure mehr vorhanden ist. Wenn man vom Gesamt- O_2 -Verbrauch den Verbrauch der Parallelproben ohne Substratzusatz in Abzug bringt, so erhält man den Sauerstoffverbrauch, der auf den Glutaminsäureabbau zurückgeht. Bei quantitativer Veratmung von 1 mg Glutaminsäure würden $690\text{ mm}^3 O_2$ verbraucht. In 4 verschiedenen Ansätzen mit je 2 Parallelproben wurden Werte von $380\text{--}426\text{ mm}^3 O_2/\text{mg}$ gefunden. Es werden also für 1 Mol vollkommen veratmeter Glutaminsäure etwa 0,7 Mol oxydativ assimiliert.

Ähnliche Berechnungen ließen sich für andere Aminosäuren nicht durchführen, weil die Atmung bereits abfiel, bevor das Substrat verbraucht war. Dieser Effekt blieb aber aus, wenn man an Stelle einer einzelnen Aminosäure ein komplexes Gemisch, z. B. hydrolysiertes Pepton verwendete. In diesem Falle wurde die gleiche Atmungssteigerung erreicht wie mit Pepton und die papierchromatographische Analyse zeigte, daß alle Aminosäuren annähernd gleichmäßig abnahmen und schließlich völlig verbraucht wurden. Demnach können also die Aminosäuren nur beschränkt ineinander umgewandelt werden, und die Verwertung einfacher Substrate wird blockiert, wenn essentielle Aminosäuren fehlen. Durch eine große Zahl von Versuchen wurde geprüft, welche der im Pepton enthaltenen Verbindungen fehlen dürfen, ohne daß die Atmungsintensität stark absinkt und der Einbau blockiert wird. Es stellte sich heraus, daß das Gemisch von Glutaminsäure, Alanin, Phenylalanin und Asparaginsäure praktisch die gleiche Atmungsgeschwindigkeit ergab wie Pepton, und daß nicht nur Glutaminsäure, sondern auch Asparaginsäure und Alanin unter diesen Bedingungen vollkommen aus der Lösung verschwanden.

In einem größeren Ansatz wurden zu Proben einer einheitlichen Suspension gleiche Absolutmengen der 4 genannten Verbindungen entweder allein oder in Kombination miteinander gegeben, die Atmung gemessen und nach 2 bzw. 5 Std eine kleine Probe chromatographiert. Die Aminosäuremengen wurden auf den Chromatogrammen nach der Fleckenintensität geschätzt. Die Tab. 4 gibt einen Überblick über die Ergebnisse. Gibt man die Säuren allein, so wird keine innerhalb der 5 Std vollkommen verbraucht. Kombiniert man sie, so verschwinden Asparagin- und Glutaminsäure vollkommen, Alanin bis auf einen kleinen Rest und nur Phenylalanin wird nicht verstärkt aufgenommen. In Kombination mit Phenylalanin wird jede der anderen Säuren restlos

verbraucht, während die Kombination Alanin + Asparaginsäure keine derartige Förderung ergibt. Vergleicht man den Sauerstoffverbrauch mit dem jeweiligen Substratverbrauch, so kann man keine Parallelität feststellen. Gibt man z. B. Glutaminsäure allein, so werden in 5 Std etwa 90% = 1215 γ verbraucht und dabei 637 mm³ O₂ zusätzlich aufgenommen. Bei der Kombination der 4 Verbindungen entspricht einem zusätzlichen O₂-Verbrauch von 775 mm³ das Verschwinden von 90%

Tabelle 4. Aminosäure-Kombinationen

Ansatz	Substrat	120 min		255 min	
		O ₂ -Verbrauch in mm ³	Rest in %	O ₂ -Verbrauch in mm ³	Rest in %
I	Alanin	452,8	30	990,7	20
II	Asparaginsäure	447,9	30	900,2	20
III	Glutaminsäure	533,4	30	1116,2	10
IV	Phenylalanin	365,5	50	526,6	30
V	Alanin		20		10
	Asparaginsäure	678,0	5	1254,7	—
	Glutaminsäure		—		—
	Phenylalanin		50		30
VI	Alanin	657,9	30	1099,7	20
	Asparaginsäure		20		20
VII	Alanin	576,7	20	998,0	—
	Phenylalanin		50		40
VIII	Glutaminsäure	623,4	5	1030,4	—
	Phenylalanin		40		30
IX	Asparaginsäure	627,6	5	841,8	—
	Phenylalanin		40		30
X	Leer	265,9		479,5	
XI	Pepton	779,6		1465,7	

= 1215 γ Alanin, 100% = 1350 γ Asparagin- und Glutaminsäure und 70% = 950 γ Phenylalanin. Die Einbauleistung je oxydativ umgesetzten Substrates wird also erheblich verbessert, wenn die passenden Komponenten zum Eiweißaufbau vorhanden sind. Dabei scheint Phenylalanin eine wesentliche Rolle zu spielen.

In einigen Versuchen wurden Kombinationen von Kohlenhydraten und Aminosäuren untersucht. Es ergab sich aber weder eine signifikante Atmungssteigerung, noch ein vermehrter Einbau der Aminosäuren. Auch dieser Befund beweist, daß die Begrenzung des Aminosäureeinbaues nicht in der Energielieferung aus dem Atmungsstoffwechsel, sondern in der begrenzten Transaminierungsfähigkeit liegt.

Obwohl die oben angeführte Kombination von 4 Aminosäuren den Atmungsstoffwechsel mehrere Stunden lang auf optimalem Niveau zu

halten vermag, genügt sie nicht, um Wachstum zu ermöglichen. Tab. 5 gibt das Ergebnis einiger Kulturversuche mit verschiedenen Kombinationen wieder. Selbst bei Zusatz von Riboflavin ist der Zuwachs in den Aminosäuregemischen minimal. Auch Pepton allein führt im Vergleich zu Hefeextrakt-Pepton-Wasser nur zu schwachem Wachstum, wie bereits eingangs erwähnt. *Caulobacter* dürfte demnach sowohl bestimmte Vitamine als auch einige essentielle Aminosäuren zum optimalen Wachstum benötigen. Bei diesen hohen Ernährungsansprüchen könnte er sicherlich nicht in so „armen“ Medien wie See-, Leitungs- oder gar destilliertes Wasser leben, wenn er nicht die Fähigkeit zum Parasitismus besäße.

Tabelle 5. Zuwachs in Aminosäuregemischen (in Prozent des Ausgangswertes)

Nährlösung	24 Std	72 Std	10 Tage
Glutaminsäure, Asparaginsäure, Alanin, Phenylalanin, Tyrosin	8,25	12,25	11,5
Glutaminsäure, Asparaginsäure, Alanin, Phenylalanin	5,5	7,7	7,5
Glutaminsäure, Asparaginsäure, Alanin, Tyrosin	5,5	8,0	7,5
Glutaminsäure, Asparaginsäure, Alanin, Phenylalanin, Tyrosin + Riboflavin (10^{-4}) .	5,0	12,0	12,0
Glutaminsäure, Asparaginsäure, Alanin, Phenylalanin, Tyrosin + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6,0	12,0	12,5
Glutaminsäure, (doppelte Menge) Alanin, Asparaginsäure, Phenylalanin, Tyrosin . . .	5,0	12,25	11,75
0,5% Peptonlösung	22,0	41,0	30,5
Hefeextrakt-Pepton-Wasser	93,5	103,0	130,5

Einen Vergleich der bei Zusatz verschiedener Substrate erreichten maximalen Atmungsgeschwindigkeiten ermöglicht Tab. 6. Neben den QO_2 -Werten, bezogen auf Gesamt-N, ist auch der Prozentsatz der im gleichen Ansatz erzielten Peptonatmung und die Konzentration, bei der die betreffende Atmungsintensität gemessen wurde, angegeben.

c) Empfindlichkeit gegenüber Fermentgiften

Die Verwendung verschiedener Atmungsgifte mit mehr oder weniger gut bekanntem Wirkungsmechanismus hat in den letzten Jahren viel zur Aufklärung des Atmungsstoffwechsels beigetragen. Die Empfindlichkeit, bzw. Resistenz gegenüber derartigen Giften kann als Anhaltspunkt dafür dienen, ob gewisse Abbauewege von dem betreffenden Organismus eingeschlagen werden oder nicht. Als Gifte des Kohlenhydratabbaues nach dem EMBDEN-MEYERHOF-Schema wurden Monojodessigsäure und Fluorid, zur Hemmung der dehydrierenden Decarboxylierung der Brenztraubensäure zur Essigsäure wurde Arsenit, als Schwermetallgifte KCN

und o-Phenanthrolin, als allgemeines Phosphorylierungsgift Arsenat und zur Entkopplung der Atmungskettenphosphorylierung 2,4-Dinitrophenol und Azid verwendet (vgl. JAMES, 1953).

Tabelle 6. NQO_2 -Werte für die geprüften Substrate

Verbindung	Höchster erreichter NQO_2	Prozent der Pepton- atmung	Zeit in Mi- nuten nach Substrat- Zugabe	Konzentration in Mol
Zucker				
Arabinose	22,0	33,8	45	$3 \cdot 10^{-1}$
Xylose	26,0	40,0	50	$3 \cdot 10^{-1}$
Fructose	29,0	44,6	15	$3 \cdot 10^{-1}$
Galaktose	32,0	49,2	10	$3 \cdot 10^{-1}$
Glucose	30,0	46,1	50	$3 \cdot 10^{-1}$
Lactose	20,5	31,5	10	$3 \cdot 10^{-1}$
Mannose	23,0	35,3	15	$3 \cdot 10^{-1}$
Cellobiose	49,0	75,2	45	$3 \cdot 10^{-1}$
Maltose	40,0	61,5	20	$3 \cdot 10^{-1}$
Rhamnose	21,5	33,1	10	$3 \cdot 10^{-1}$
Stärke	44,0	67,3	45	$3 \cdot 10^{-1}$
Alkohole				
Methanol	25,0	41,6	10	$4 \cdot 10^{-1}$
Äthanol	27,0	45,0	10	$2,7 \cdot 10^{-1}$
Glycerin	25,0	41,6	10	$1,4 \cdot 10^{-1}$
Organische Säuren				
Ameisensäure	15,1	25,7	30	$1 \cdot 10^{-1}$
Äpfelsäure	29,5	49,1	15	$1 \cdot 10^{-1}$
Bernsteinsäure	18,5	27,0	20	$1 \cdot 10^{-1}$
Brenztraubensäure	20,5	34,1	15	$1 \cdot 10^{-1}$
Citronensäure	11,5	19,1	10	$1 \cdot 10^{-1}$
Essigsäure	32,0	53,0	15	$1 \cdot 10^{-1}$
Fumarsäure	17,5	29,2	15	$1 \cdot 10^{-1}$
Milchsäure	5,0	8,3	30	$1 \cdot 10^{-1}$
Oxalsäure	14,5	24,1	20	$1 \cdot 10^{-1}$
Propionsäure	8,3	13,8	45	$1 \cdot 10^{-1}$
Weinsäure	10,5	17,4	45	$1 \cdot 10^{-1}$
Aminosäuren				
Alanin	38,5	62,0	10	$1 \cdot 10^{-1}$
Asparagin	27,5	50,0	10	$1 \cdot 10^{-1}$
Asparaginsäure	26,5	48,1	10	$1 \cdot 10^{-1}$
Glutamin	42,5	68,5	10	$1 \cdot 10^{-1}$
Glutaminsäure	52,5	84,5	35	$1 \cdot 10^{-1}$
Glycin	30,5	49,1	10	$1 \cdot 10^{-1}$
Leucin	32,5	52,4	10	$1 \cdot 10^{-1}$
Methionin	24,5	44,5	10	$1 \cdot 10^{-1}$
Tyrosin	64,0	103,2	10	$1 \cdot 10^{-1}$
Pepton	60,5	100,0	40	0,5%
Leer	12,5	20,6	50	

Die Wirkung der Gifte wurde in doppelter Weise geprüft. Zunächst im Wachstumstest, in dem auf Hefeextrakt-Pepton-Agar, der mit verschiedenen Konzentrationen der einzelnen Gifte versetzt war, *Caulobacter* aufgeimpft wurde. Dann aber auch durch direkte Atmungsmessung. Dabei wurde den Suspensionen 0,5% Pepton zugesetzt und 30 min die Atmung gemessen. Dann wurde das Gift aus dem seitlichen Ansatz in

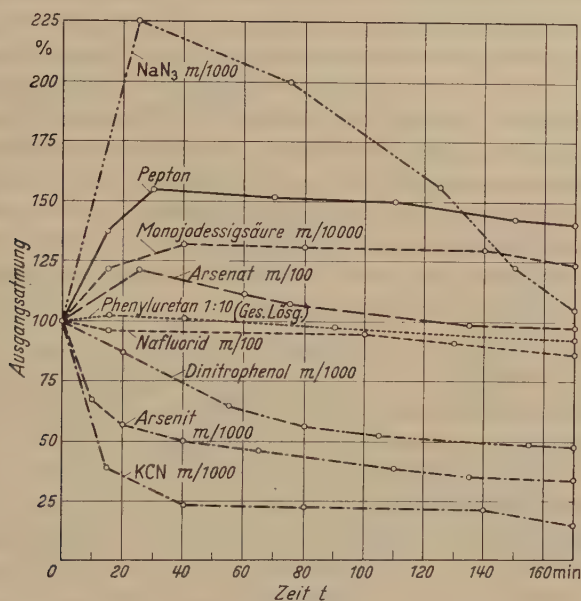


Abb. 15. Hemmung der Sauerstoffaufnahme durch verschiedene Gifte, $t = 27^\circ \text{C}$

die Atmungströge gekippt und der O_2 -Verbrauch der Folgezeit auf die als 100% gesetzte Ausgangsatmung (O_2 -Verbrauch in den ersten 30 min) bezogen. Abb. 15 zeigt, daß *Caulobacter* gegen alle Gifte stark empfindlich ist. Der Wachstumstest lieferte die gleichen Ergebnisse. Demnach dürfte der Atmungsstoffwechsel von *Caulobacter* im wesentlichen nach den üblichen Mechanismen verlaufen.

Schlußbetrachtung

Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen die Anschauung HOUWINKS, daß es sich bei *Caulobacter* tatsächlich um ein ektoparasitisches Bakterium handelt, das vorwiegend grampositive Bacillen befällt und diese aussaugt. Entgegen den Befunden von GRULA u. Mitarb. (1954) wächst der von uns untersuchte *Caulobacter*-Stamm nicht in einfachen,

synthetischen Nährlösungen, sondern ist auf die Zufuhr verschiedener Vitamine und einiger essentieller Aminosäuren angewiesen. Es konnte allerdings bisher noch nicht festgestellt werden, welche dieser Verbindungen im einzelnen notwendig sind.

Habituell erinnert *Caulobacter* stark an *Hyphomicrobium*, das kürzlich von MEVIUS (1953) näher untersucht wurde. Man könnte die Ausbildung des Stieles mit der Hyphenbildung vergleichen, doch dient bei *Hyphomicrobium* die Hyphe nicht zum Anhaften, sondern es entsteht am Ende derselben ein neues Individuum. Ein derartiger Vorgang konnte bei *Caulobacter* in keinem Falle beobachtet werden. Die Vermehrung erfolgt ausschließlich durch normale Zweiteilung, die ihrerseits bei *Hyphomicrobium* völlig fehlt. Auch die Ernährungsansprüche beider Organismen sind grundlegend verschieden. Niedere Carbonsäuren, die von *Caulobacter* kaum umgesetzt werden, sind für *Hyphomicrobium* optimale Substrate. Außerdem wächst letzteres nicht ohne Anwesenheit von CO_2 , das chemosynthetisch assimiliert wird, während *Caulobacter* völlig unabhängig von CO_2 wächst, wie eigene Versuche zeigten.

Trotz diesen physiologischen Unterschieden und der andersartigen Vermehrung durch Knospung kann eine nähere Verwandtschaft beider Formen nicht ganz ausgeschlossen werden. Schon HENRICI u. JOHNSON (1935) stellten sie zusammen zu den *Caulobacteriales*, und nach unseren heutigen Kenntnissen über die Beschaffenheit des Stieles bzw. der „Hyphe“ ist die Zusammenfassung dieser beiden Formen berechtigter als die Einbeziehung der mit Schleimstielen versehenen übrigen Bakterienarten dieser Ordnung in eine gemeinsame systematische Einheit (vgl. BERGEYS Manual 1948). Bei einer Neugliederung sollte man eine schärfere Trennung zwischen den Formen mit Schleimstielen und *Caulobacter* bzw. *Hyphomicrobium*, bei denen der Stiel ein Fortsatz der Zelle ist, durchführen und sie in getrennten Ordnungen unterbringen, worauf bereits früher hingewiesen wurde (KANDLER u. Mitarb. 1954, HOUWINK 1955). Bemerkenswert erscheint uns, daß die Stiele beider Formen eine Innenstruktur in Form dichter „Querbalken“ aufweisen, die bei *Hyphomicrobium* etwas breiter und häufiger sind als bei *Caulobacter* und vielleicht als Hinweis auf die Homologie beider Bildungen gewertet werden können.

In ernährungsphysiologischer Hinsicht nimmt der von BOWERS u. Mitarb. (1954) benützte *Caulobacter*-Stamm eine vermittelnde Stellung zwischen unserem Stamm und *Hyphomicrobium* ein, da er nicht parasitiert und mit Ammonsulfat als alleiniger Stickstoffquelle lebt. Es ist zu hoffen, daß in Zukunft noch mehrere Stämme „gestielter“ Bakterien isoliert und untersucht werden können und daß sich dann auch bessere Ansatzpunkte für eine systematische Einordnung ergeben.

Zusammenfassung

Bei fortlaufender Beobachtung von Mikrokulturen im Phako konnte festgestellt werden, daß der von HOUWINK isolierte *Caulobacter*-Stamm tatsächlich auf Bacillen parasitiert und diese tötet. Befallen werden ausschließlich grampositive Bakterien. Die Befallfreudigkeit hängt vom Alter, den osmotischen Verhältnissen und der Substratversorgung ab.

Bei saprophytischer Ernährung müssen Aminosäuren und Vitamine zugeführt werden. Es gelang bisher nicht, einen vollsynthetischen Nährboden zu finden.

Kohlenhydrate und niedere Carbonsäuren werden nur mit geringer Geschwindigkeit veratmet, während Aminosäuren sehr gute Substrate sind. *Caulobacter* kann wahrscheinlich einige Aminosäuren nicht selbst synthetisieren, da eine Aufnahme von einzelnen Aminosäuren über längere Zeit hin nur dann erfolgt, wenn andere zugegeben werden. So wird z. B. Asparaginsäure und Alanin erheblich rascher eingebaut, wenn gleichzeitig Phenylalanin geboten wird. Letzteres dient dabei nicht einfach als Energiequelle, denn es läßt sich nicht durch Kohlenhydrate ersetzen.

Die Empfindlichkeit gegen eine Reihe von Atmungsgiften bekannter Wirkungsweise macht es wahrscheinlich, daß der Atmungsstoffwechsel nach den bekannten Mechanismen abläuft.

Auf eine eventuelle nähere Verwandtschaft mit *Hyphomicrobium* wird hingewiesen und die systematische Stellung kurz diskutiert.

Herrn Direktor Dr. B. FREYTAG möchten wir hier für die zeitweilige Überlassung eines Arbeitsplatzes herzlichen Dank sagen.

Literatur

- BOWERS, L. E., H. R. WEAVER, E. GRULA and O. F. EDWARDS: J. Bacter. 68, 194 (1954). — BYSTRICKY, V.: Biologia (Bratislava) 9, 566 (1954). — CRAMER, F.: Papierchromatographie. Weinheim 1953. — DIXON, M., and R. KEILIN: Manometric methods. Cambridge 1952. — GRULA, A. E., and S. E. HARTSELL: J. Bacter. 68, 498 (1954). — GRULA, E. A., H. R. WEAVER and O. F. EDWARDS: J. Bacter. 68, 201 (1954). — HALLMANN, L.: Bakteriologische Nährböden. Stuttgart 1953. — HENRICI, A. T., and D. E. JOHNSON: J. Bacter. 30, 61 (1935). — HOUWINK, A. L.: Nature (Lond.) 168, 654 (1951). — Experientia (Basel) 8, 385 (1952). — Antonie van Leeuwenhoek 21, 49 (1955). — HOUWINK, A. L., and W. VAN ITTERSON: Biochim. et Biophysica Acta 5, 10 (1950). — JAMES, W. O.: Annual. Rev. Plant. Physiol. 4, 59 (1953). — JONES, M.: Zbl. Bakter. II. Orig. 14, 459 (1905). — KANDLER, O., C. ZEHENDER u. O. HUBER: Arch. Mikrobiol. 21, 57 (1954). — KLEIN, G.: Handbuch der Pflanzenanalyse. Wien 1931. — MEVIUS, W. jr.: Arch. Mikrobiol. 19, 1 (1953). — OMELIANSKY, V.: J. Mikrobiol. (russisch) 1, 24 (1914). — PIEKARSKY, G.: Arch. Mikrobiol. 8, 428 (1937). — ROBINOW, C. F.: Anhang in DUBOS: The bacterial cell. New York 1949.

(Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen,
Biochemische Abteilung)

Untersuchung über die Bildung des Actinomycins X

Über die Beeinflussung des Komponentenverhältnisses beim Actinomycin X durch Variation der mikrobiologischen Kulturbedingungen

Von
H. H. MARTIN und G. PAMPUS

Mit 12 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. März 1956)

Durch BROCKMANN u. Mitarb. (1949—1955) sind während der letzten Jahre in einer größeren Sammlung von Streptomyceten verschiedenster Herkunft insgesamt 29 Strahlenpilz-Kulturen aufgefunden worden, die rote, antibiotisch wirksame Actinomycine bilden. Aus diesen Organismen wurden drei verschiedene Gruppen von Actinomycinen in kristallisierter und nach den Kriterien der klassischen organischen Chemie einheitlicher Form isoliert und als Actinomycin C, Actinomycin X und Actinomycin I bezeichnet. Bei Anwendung moderner Trennungsvorgahren wie der fraktionierten Gegenstromverteilung und der Verteilungschromatographie stellte sich jedoch heraus, daß jedes der drei Actinomycin-Gemische in eine Anzahl reiner Actinomycine zerlegt werden kann, die sich in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften recht ähnlich sind. Actinomycin X besteht in der Hauptsache aus den drei Komponenten X_0 , X_1 und X_2 , daneben findet sich in geringer Menge noch eine Reihe von sogenannten „Nebenactinomycinen“, die nach ihrer Lage im Verteilungschromatogramm als X_{0a} , X_{1a} , X_3 und X_5 bezeichnet werden (BROCKMANN 1954).

Bei der chromatographischen Reinigung des rohen Actinomycin X durch Adsorption an Aluminiumoxyd der Aktivitätsstufe II (BROCKMANN 1941) stellten wir fest, daß ein Teil des Actinomycins besonders fest am Adsorbens haftet und sich nur mit Aceton oder Methanol eluieren läßt. In dem Acetoneluat findet sich fast das gesamte Actinomycin X_0 . Diese Beobachtung ließ vermuten, daß Actinomycin X_0 zusätzlich funktionelle Gruppen enthält, die für die starke Adsorption am Aluminiumoxyd verantwortlich sind und die allen anderen Actinomycinen fehlen. Eine genauere Untersuchung der Eigenschaften des X_0 scheiterte zunächst an der geringen Menge der zur Verfügung stehenden Substanz. Wir wollten deshalb untersuchen, ob man auf mikrobiologischem Wege

durch Auswahl geeigneter Streptomycetenstämme oder durch Variation der Kulturbedingungen die Bildung eines bestimmten Actinomycins auf Kosten der anderen fördern und so auch zu einer höheren Ausbeute an X_0 gelangen kann.

Methodik

Zur Kultur der Actinomycin liefernden Streptomyceten wurden folgende Nährlösungen verwendet: 1. Glycerin-Glykokoll-Nährlösung nach O. v. PLOTTO (1940). Nach Zusatz von 1,5% Agar diente dieses Nährmedium auch als Substrat für die Stammkulturen der untersuchten Streptomyceten. — 2. Modifizierte CZAPEK-THOM-Nährlösung. An Stelle von Saccharose wurde Glycerin als Kohlenstoffquelle verwendet. — 3. Glycerin- NaNO_3 -Nährlösung nach LINDENBEIN (1952). — 4. Haferflocken-Agar nach KÜSTER¹. 20 g Haferflocken werden in 1 Liter Leitungswasser 20 min gekocht, filtriert und das Filtrat wieder auf 1 Liter aufgefüllt. Danach werden 15–20 g Agar zugesetzt und gut verkocht. Der Nährboden wird auf pH 7,2 eingestellt. — 5. Glucose-Pepton-Agar nach KUTZNER u. KÜSTER¹: 1% Glucose, 1,2% Pepton Brunnengräber, 0,6% Probacit „Maggi“, 1,5% Agar. (Abweichungen sind bei den einzelnen Versuchen angegeben.)

Alle Nährlösungen wurden auf ein Anfangs-pH von 7,2 eingestellt. In den meisten Fällen fügten wir den Medien 5–10% Hefekochsaff zu, der nach der Vorschrift von DIDDENS u. LODDER (1942) hergestellt wurde.

Wir verließen das bisher (BROCKMANN u. Mitarb. 1949–1955) geübte Verfahren der Actinomycinproduktion in Oberflächenkultur zugunsten der Submersmethode in Form der Schüttelkultur und der Submerskultur.

1. Schüttelkultur. 1-Liter-Erlenmeyerkolben mit je 150 cm³ Nährlösung wurden auf einer Reziprok-Schüttelmaschine mit einem Ausschlag von 8 cm und einer Frequenz von 100 Schüttelbewegungen je Minute geschüttelt.

2. Submerskultur: in 15-Liter-Fermentern wurden 10 l Nährlösung belüftet und mechanisch gerührt, dabei konnten Luftzufuhr und Rührgeschwindigkeit variiert werden.

Das Impfmateriel für beide Submersverfahren wurde durch Schüttelkultur gewonnen. Zur Anzucht verwendeten wir jeweils eine Nährlösung von der gleichen Zusammensetzung wie für die später zu beimpfenden Ansätze. Von einer Agar-Stammkultur wurde eine erste Serie von Schüttelkolben beimpft und von deren Submersmycel nach 2-tägiger Kultur je 1 cm³ auf eine zweite Serie von Schüttelkolben übertragen. Nach abermals zweitägigem Schütteln wurden mit dem gebildeten, feinflockigen Mycel die eigentlichen Ansätze beimpft: die Schüttelkolben durch Einpipettieren von je 1 cm³ je Kolben, die 15-Liter-Fermenter mit dem gesamten Inhalt von 2 Schüttelkolben. Wir verfolgten an den wachsenden Kulturen die Zunahmen des Myceltrockengewichts, das pH, den Glycerinverbrauch (DIMAR 1940) und die Menge des gebildeten Actinomycins.

In den beiden Submersverfahren wurden große Mengen grüngelben bis dottergelben Mycels mit einem hohen Gehalt an Actinomycin X gebildet. Zur Gewinnung des Gesamtactinomycins wurde das Mycel von der Nährlösung abzentrifugiert, das feuchte Sediment in Aceton suspendiert, mazeriert und zentrifugiert. Nach mehrmaligem Wiederholen des Arbeitsganges war das im Mycel enthaltene Actinomycin quantitativ in Aceton überführt. Das Aceton wurde im Vacuum abdestilliert, der Rückstand mit dem Kulturfiltrat vereinigt und das Actinomycin durch mehrmaliges Ausschütteln mit Butylacetat extrahiert. Die Actinomycin-Lösung wurde im Vacuum bis auf wenige Kubikzentimeter eingengt und mit Petroläther versetzt. Dabei fiel das Actinomycin aus, während störende Lipidstoffe in Lösung blieben.

¹ Persönliche Mitteilung.

Die Actinomycinausbeute wurde entweder gravimetrisch nach chromatographischer Reinigung an Aluminiumoxyd oder bei kleinen Mengen aus der antibiotischen Wirksamkeit gegen *Staphylococcus aureus* bestimmt, wobei wir uns auf ein kristallisiertes Actinomycin X-Präparat (Komponentengemisch) als Standard bezogen. Zur schnellen Identifizierung der Actinomycine, die von den verschiedenen Stämmen unserer Sammlung gebildet wurden, verwendeten wir die von BROCKMANN u. GRÖNE (1954) entwickelten papierchromatographischen Methoden. Da eine Unterscheidung der Actinomycine X und I in dem Lösungsmittelsystem n-Dibutyläther + Butanol (3:2)/10%ige Natrium-m-kresotinat-Lösung nicht ohne weiteres möglich war, weil die Hauptkomponenten der beiden Actinomycine: X_1 und I_0 bzw. X_2 und I_1 hier die gleichen Laufgeschwindigkeiten besitzen, benutzten wir noch ein zweites Lösungsmittelpaar: Butylacetat + n-Dibutyläther (3:1)/10%ige Natrium-m-kresotinat-Lösung, in dem die stärkste Komponente des Actinomycin I, das I_1 , mit der gleichen Geschwindigkeit wie X_1 läuft. Zwei Chromatogramme mit verschiedenen Lösungsmittelsystemen erlauben eine eindeutige Unterscheidung der Actinomycine I und X.

Zur Berechnung der Komponentenverhältnisse $\frac{X_1 + X_2}{X_0}$ und $\frac{X_2}{X_1}$ in einem X-Gemisch bestimmten wir bei größeren Actinomycinausbeuten nach Adsorption an Aluminiumoxyd gravimetrisch die Menge des mit Essigester ($X_1 + X_2$) bzw. mit Aceton (X_0) eluierten Actinomycins nach Abdampfen der Lösungsmittel. Standen nur kleine Actinomycinmengen zur Verfügung, so trennten wir diese papierchromatographisch in ihre Komponenten auf, schnitten die Actinomycinzonen aus, eluierten die Komponenten mit Methanol und colorimetrierten die methanolischen Actinomycinlösungen im Beckman-Spektralphotometer im Absorptionsmaximum des Actinomycins bei 446 m μ . Da in dem vorkommenden Konzentrationsbereich (Extinktionen zwischen 0,37 und 0,06) die Extinktion der Konzentration des Actinomycins proportional ist, konnte das Komponentenverhältnis direkt aus dem Verhältnis der Extinktionen berechnet werden. Bei höheren Actinomycinkonzentrationen ($> 0,05 \text{ mg/cm}^3$ — $E > 0,88$) ist dies nicht mehr möglich, weil das LAMBERT-BEERSche Gesetz nicht mehr befolgt wird!

Um zu entscheiden, ob eine im Chromatogramm auftretende orangefarbene Zone durch eine Actinomycin-Komponente hervorgerufen wird, bedienten wir uns der antibiotischen Diffusionsplatten-Methode nach GOODALL u. LEVI (1946).

Aus dem Ringpapierchromatogramm wurde ein 1—2 mm breiter, radialer Streifen ausgeschnitten, die fragliche Zone mit Bleistift markiert und der Streifen auf einen mit *Staphylococcus aureus* beimpften Nähragar gelegt. Nach 36stündiger Bebrütung bei 28° C konnte aus der entstandenen Hemmzone auf die antibiotische Wirksamkeit der Substanz und damit auf das Vorliegen einer Actinomycin-Komponente im Chromatogramm geschlossen werden (Abb. 3 und 4).

Bei diesen Chromatogrammen verwandten wir als Lösungsvermittler eine 1%ige Lösung von Natrium-phenanthren-sulfonat, weil das sonst benutzte Natrium-m-kresotinat selbst antibakterielle Eigenschaften zeigt.

Ergebnisse

1. Morphologisch-systematische Beobachtungen an den Actinomycin X bildenden Streptomyceten¹

Von den 29 Streptomyceten unserer Sammlung, die Actinomycin produzieren, bilden 15 Stämme Actinomycin X, die restlichen Actinomycin C und I. Die systematische Bearbeitung unserer Actinomycin-

¹ In Zusammenarbeit mit H. KUTZNER.

Bildner ist noch nicht abgeschlossen, doch sollen einige Teilergebnisse hier angeführt werden.

Fast alle Actinomycin X bildenden Stämme (mit Ausnahme der Kulturen *Ital 1130* und *1131*) und ebenso die Actinomycin I-Produzenten besitzen als gemeinsames Merkmal die Fähigkeit zur Bildung eines braunschwarzen Pigmentes auf Pepton-haltigen Nährböden.

Allen Actinomycin C-Bildnern fehlt diese Eigenschaft. Diese Unterscheidung entspricht wohl der von WAKSMAN (1954) vorgenommenen Einteilung der Actinomycin bildenden Streptomyceten in eine „chromogene“ und eine „achromogene“ Gruppe.

Innerhalb der X-bildenden Stämme läßt sich eine Einteilung in drei Untergruppen vornehmen, deren Eigenschaften in Tab. I dargestellt sind.

Zur Gruppe I gehören die Stämme: *Sötenich 3*, *Halde 1160*, *SV 1948* und *Am 634*. Die Stämme sind unter sich recht einheitlich und morphologische Varianten wurden nur selten beobachtet. Die Actinomycinausbeute aus diesen Kulturen ist ziemlich gering (im Mittel etwa 20 mg Actinomycin/Liter). In allen beschriebenen Merkmalen steht die I. Untergruppe dem Actinomycin I bildenden Stamm *Imme 797* unserer Sammlung recht nahe.

Gruppe II umfaßt die Stämme: *Wind 756*, *Din 452*, *Ag 2023*, *2025*, *2026*, *2027* und *2028*. Diese Gruppe ist nicht so einheitlich wie die vorhergehende, und spontan auftretende, morphologische Veränderungen kommen häufig vor. Durch Anwendung der von PFENNIG (1953) angegebenen Methode zur Gewinnung reiner Kolonien durch Membranfiltration von Sporensuspensionen und Aussaat der so voneinander getrennten und von Mycelfragmenten befreiten Sporen auf Glycerin-Glykokoll-Agar konnten wir aus mehreren Stämmen der Gruppe II eine Anzahl von morphologischen Varianten isolieren, deren charakteristische Merkmale ein hellgelbes, samtiges Luftmycel und die Bildung eines intensiv olivgrünen, löslichen Pigmentes waren. Der grüne Farbstoff, der auch in flüssigen Medien auftrat, erschien uns deswegen bemerkenswert, weil wasserlösliche, grüne Pigmente bei Streptomyceten und auch bei anderen Mikroorganismen recht selten anzutreffen sind. Die Stämme, die diesen Farbstoff bilden, sind aber sehr instabil und schlagen häufig nach wenigen Überimpfungen in die Ausgangsform mit mausegrauem Luftmycel und goldgelbem, löslichem Pigment zurück.

Zur Gruppe III, der das braunschwarze Pigment auf Pepton-Nährböden fehlt, gehören nur 2 Stämme: *Ital 1130* und *Ital 1131*.

2. Zusammensetzung des Actinomycin X aus verschiedenen Stämmen

Wir stellten von allen Actinomycin X bildenden Stämmen kleine Mengen Actinomycin in ruhender Kultur und nach dem Submersverfahren her und untersuchten sie papierchromatographisch. Dabei zeigte

Tabelle 1

	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III
A. Morphologie auf Haferflocken-Agar	Wenig charakteristisches, aus mehr oder weniger langen, geraden oder seltener gewellten Hyphen bestehendes „besenförmiges“ Mycel	Monopodiale Bäumchen, teilweise auch längere, unregelmäßig verzweigte Lufthyphen mit mäßig langen, fertilen, an den Enden umgebogenen Seitenästen. Spiralen bei verschiedenen Stämmen mit unterschiedlicher Häufigkeit.	An mittelhohen, monopodialen Bäumchen sehr zahlreiche, kurzgestielte winzige Spirallen mit 1—3 Windungen.
B. Habitus			
1) Haferflocken-Agar	Gut bis mäßig versportetes Mycel, unterseits schwach gelb. Hellgelbes, lösliches Pigment. Luftmycel hellgrau oder schwach grünlich-gelb.	Krustiges Mycel, unterseits gelbgrün. Üppiges, samtartiges, mausgrau versportetes Luftmycel. Lösliches Pigment schwach gelbgrün.	Krustiges Mycel, unterseits schwach gelb-grün. Gelbgrünes lösliches Pigment. Dünnes, violettes Luftmycel.
2) CZAPEK-THOM-Agar	Gutes Wachstum, Mycel unterseits hellgelb, lösliches Pigment hellgelb oder fehlend. Spärliches, mehliges, hellgelbes Luftmycel.	Runzeliges Mycel, unterseits gelb, hellgelbes lösliches Pigment. Luftmycel spärlich, schwach grünlich oder fehlend.	Mäßiges Wachstum, Mycel unterseits farblos oder schwach gelbgrün. Dünnes, violettes Luftmycel.
3) Glycerin-Glykokoll-Agar	Knorpelig lichenoides Mycel, unterseits sattgelb bis gelbbraun. Gelbes, lösliches Pigment. Dünnes, staubiges, cremefarbiges Luftmycel.	Üppiges, krustiges, runzeliges Mycel, unterseits braungelb oder gelbgrün. Lösliches Pigment goldgelb oder grüngelb. Samtartiges mausgrau versportetes Luftmycel.	Üppiges, krustiges Mycel, unterseits gelb bis braungelb. Mäßig lösliches Pigment goldgelb. Üppiges samtiges grauviolettes Luftmycel.
4) Glucose-Pepton-Agar	Schwaches, krustiges Wachstum. Braunschwarzes, lösliches Pigment. Kein versportetes Luftmycel.	Mäßiges bis schwaches krustiges Mycel. Braunschwarzes, lösliches Pigment. Mausgrau versportetes Luftmycel.	Schwaches, krustiges Wachstum. Mycel unterseits gelb. Lösliches Pigment mäßig goldgelb. Luftmycel spärlich oder fehlend.
5) Lackmus-Milch	In 5—9 Tagen koaguliert. Keine oder nur schwache Peptonisierung.	In 13—18 Tagen vollständige Peptonisierung ohne vorherige Koagulation.	In 5—9 Tagen koaguliert. Peptonisierung schwach oder fehlend.

sich, daß der relative Anteil der Hauptkomponenten und das Vorkommen von „Nebenactinomycinen“ von Stamm zu Stamm durchaus verschieden ist. In bezug auf das uns besonders interessierende Actinomycin X_0 konnten wir feststellen, daß einige Stämme ein einfaches, im Chromatogramm einheitliches X_0 bildeten (Abb. 1), während dieses bei anderen Stämmen offensichtlich aus zwei Teilkomponenten bestand (Abb. 2). Mit Hilfe der für Actinomycine charakteristischen Reaktionen (BROCKMANN 1954): Halochromie mit

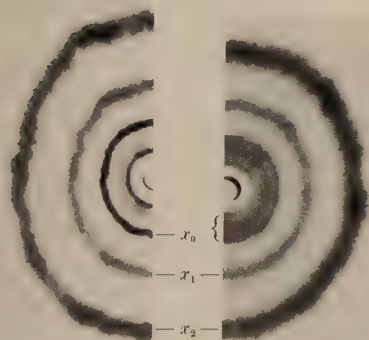


Abb. 1. Actinomycin X
aus *Ital 1131*
Glycerin-Glykokoll
Schüttelkultur

Abb. 2. Actinomycin X
aus *Din 452* modif.
CZAPEK-THOM-Asparagin
Schüttelkultur

Von außen nach innen: Actinomycin X_2 , X_1 , X_0
Papierchromatogramme im System
Butylacetat + Dibutyläther (3 : 1)/10% Na-Kresotinat

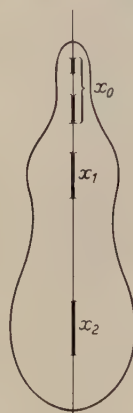


Abb. 3.
Actinomycin X
aus *Halde 1160*

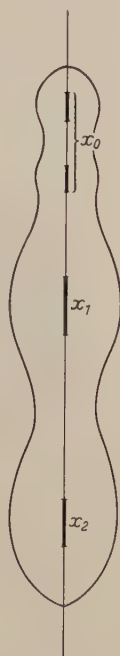


Abb. 4
Actinomycin X
aus *Din 452*

Diffusionsplattentest mit Papierchromatogrammen im System Butylacetat/1% Na-Phenanthrensulphonat. Die Umrißlinie kennzeichnet den Bereich der jeweiligen Hemmzone für die auf dem Mittelstück angegebenen Chromatogramm-Bestandteile

konz. Salzsäure, Grünfärbung mit Zinn-II-chlorid-Salzsäure-Lösung, antibiotischer Diffusionsplatten-Test, stellten wir fest, ob es sich bei diesen Zonen um Actinomycine oder um Begleitstoffe handelte.

Abb. 3 und 4 zeigen die Ergebnisse der Diffusionsplatten-Teste von Papierchromatogrammen, die von den Actinomycinen X der Stämme *Halde 1160* und *Din 452* hergestellt wurden.

In beiden Fällen besteht das X_0 aus zwei Komponenten. Bei *Din 452* verursachen diese trotz geringer räumlicher Trennung zwei deutlich getrennte Hemmzonen. Bei *Halde 1160* dagegen ist nur im Bereich der am langsamsten wandernden X_0 -Zone eine Hemmwirkung zu erkennen. Demnach läßt sich das X_0 aus *Din 452* papierchromatographisch in zwei X_0 -Actinomycine auftrennen, während wir bei *Halde 1160* ein Gemisch von einem Actinomycin mit einer antibiotisch unwirksamen Substanz

vorfinden. Wir haben im folgenden das X_0 immer dann als Einheit behandelt und bestimmt, wenn alle Teilkomponenten die Actinomycin-Reaktionen gaben.

Inzwischen haben BROCKMANN u. PAMPUS (1955) das Actinomycin X_0 durch Verteilungschromatographie an Cellulosepulver im präparativen Maßstab aufgetrennt und dabei eine ganze Anzahl verschiedener, neuer Actinomycin-Komponenten aufgefunden und zum Teil in kristallisierter Form isoliert.



Abb. 5. Actinomycin X aus S. V. 1948

Glycerin-Glykokoll
Oberflächenkultur

Sektorenschromatogramm im System Butylacetat + Dibutyläther (3 : 1)/10% Na-Kresotinat



Abb. 6. Actinomycin X aus S. V. 1948

Glycerin- NaNO_3
Oberflächenkultur

3. Beeinflussung der Zusammensetzung des Actinomycin X durch Variation der mikrobiologischen Kulturbedingungen

Ausgehend von ziemlich variablen Kulturen Actinomycin C bildender Streptomyceten haben BROCKMANN u. PFENNIG (1953) vergeblich versucht, durch Einsporkulturen zu reinen Linien zu kommen, die nur eine Komponente des Actinomycin C produzieren. Danach war nicht zu erwarten, daß man auf ähnlichem Wege unter den X-Bildnern ohne weiteres einen Stamm finden würde, der reines Actinomycin X_0 erzeugt.

Wir versuchten daher, ausgehend von Stämmen mit deutlicher X_0 -Bildung, durch systematische Abwandlung der Kulturbedingungen den X_0 -Gehalt des erzeugten Actinomycins zu steigern. Bei manchen Stämmen beobachteten wir schon nach sehr einfachen Eingriffen erstaunliche Veränderungen in der Zusammensetzung des Actinomycins. Stamm SV 1948 erzeugt in ruhender Kultur in Glycerin- NaNO_3 -Nährlösung ein fast nur aus der Komponente X_1 bestehendes Actinomycin (Abb. 6), während in Glycerin-Glykokoll-Nährlösung in Oberflächen- und Submerskultur ein aus X_0 , X_1 und X_2 bestehendes Actinomycin gebildet wird (Abb. 5).

Die weiteren Versuche über den Einfluß der Kulturbedingungen führten wir mit dem Stamm Din 452 durch, einem aus einer argen-

tinischen Erdprobe stammenden Streptomyceten, der neben X_1 und X_2 ein im Papierchromatogramm aus 2 Komponenten bestehendes Actinomycin X_0 bildet.

Tabelle 2. Abhängigkeit der Actinomycinausbeute vom C/N-Verhältnis

Glycerin %	C/N	Rest- glycerin %	Rest-KNO ₃ %	Trocken- mycel g/l	Actinomycin	
					mg/L	$\frac{X_1 + X_2}{X_0}$
0,5	2,4	—	0,21	1,9	17	11,7
2	9,6	—	0,08	8,7	38,6	15,1
4	19,2	—	—	11,8	48,3	8,3
8	38,4	5,5	—	16,8	8,2	5,6

Schüttelkultur: modif. CZAPEK-THOM, 0,64% KNO₃, 0,5% CaCO₃, 10% Hefekochoft.

a) Variation des Kohlenstoff-Stickstoff-Verhältnisses in der Nährlösung

Der Einfluß verschiedener C/N-Verhältnisse wurde in Schüttelkultur mit modifizierter CZAPEK-THOM-Nährlösung untersucht. Dabei war die Konzentration der Stickstoff-Quelle in allen Fällen die gleiche. Nach einer Kulturdauer von 8 Tagen bestimmten wir das Myceltrockengewicht, die Ausbeute an Roh-Actinomycin und den Anteil des gebildeten Actinomycin X_0 . Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

In Abb. 7 ist der zeitliche Verlauf der Actinomycinbildung (im Kulturfiltrat) und des Glycerinverbrauches unter dem Einfluß verschiedener C/N-Verhältnisse dargestellt.

Mit steigendem C/N-Verhältnis nimmt die insgesamt gebildete Actinomycinmenge zu, aber auch die zur Erreichung maximaler Ausbeute notwendige Zeit. Ein Kohlenstoff-Stickstoff-Verhältnis von etwa 20 liefert die beste Actinomycinausbeute, denn jenseits des Optimums C/N = 20 verläuft die Fermentation so langsam, daß höhere C/N-Verhältnisse für praktische Zwecke nicht brauchbar sind. Der Anteil des X_0 am Gesamt-

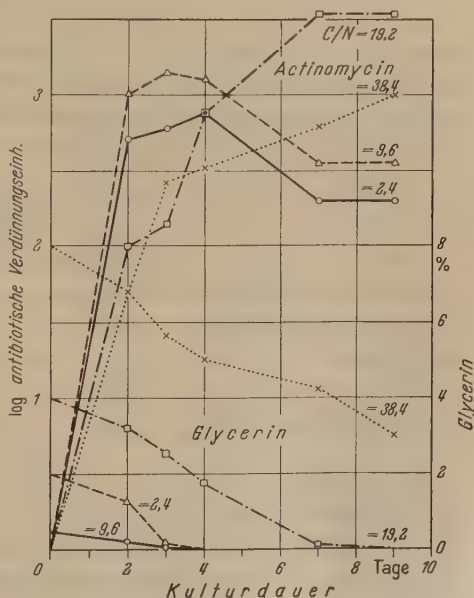


Abb. 7. Zeitlicher Verlauf der Actinomycinbildung und des Glycerinverbrauches bei verschiedenem C/N-Verhältnis in der Nährlösung

actinomycin wächst ebenfalls mit zunehmendem C/N-Verhältnis, doch liegt auch hier das durch die Ausbeute bestimmte Optimum bei $C/N = 20$. Die Actinomycinkonzentration im Kulturfiltrat zeigt ein Maximum bei vollständigem Glycerinverbrauch oder kurz danach. Später nimmt die Menge des Antibioticums wieder ab.

b) Der Einfluß der Stickstoffquelle

Die Actinomycin X bildenden Streptomyceten haben in bezug auf die Stickstoffernährung keine einheitlichen Bedürfnisse. Die optimale N-Quelle muß für jeden Stamm einzeln ermittelt werden. Tab. 3 zeigt den Einfluß zweier verschiedener N-Quellen, Glykokoll und KNO_3 , auf die Actinomycin X-Ausbeute der beiden Stämme *Wind 756* und *Din 452* nach 4-tägiger Schüttelkultur.

Tabelle 3. *Actinomycin X-Ausbeute mg/L*

	Glycerin-Glykokoll	modif. CZAPEK-THOM (N-Quelle $NaNO_3$)
<i>Din 452</i>	15,8	44,2
<i>Wind 756</i>	60,5	24,5

In einem weiteren Schüttelversuch wurde an Stamm *Din 452* die Wirkung verschiedener Stickstoffquellen untersucht. Für die Berechnung der Konzentrationen der einzelnen N-Quellen legten wir ein C/N-Verhältnis von 20 zugrunde. Die Kulturdauer bis zum vollständigen Glycerin-Verbrauch betrug 9 Tage. Tab. 4 zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 4. *Abhängigkeit der Actinomycinbildung von der N-Quelle*

N-Quelle	End-pH	Mycel- trockengewicht g/L	Gesamtactinomycin mg/L	Komponentenverhältnis $\frac{X_1 + X_2}{X_0}$
KNO_3 0,64% .	8,0	11,5	45,0	13,4
$(NH_4)_2HPO_4$ 0,4%	7,2	8,5	84,0	5,2
Asparagin 0,4%	7,5	8,6	82,1	4,9
Glutaminsäure 0,36% mit NH_3 auf pH 7,0 neutr.	6,8	10,8	29,0	4,75
Glykokoll 0,5%	6,6	14,2	14,5	5,4

Nährlösung: modif. CZAPEK-THOM mit 4% Glycerin, 10% Hefekochsaft und 0,5% $CaCO_3$.

Asparagin und Ammoniumphosphat liefern die beste Actinomycin-ausbeute und gleichzeitig den höchsten Anteil von X_0 am Gesamtactinomycin. Die Ernährungsbedingungen für bestes Mycelwachstum sind nicht die gleichen wie die für maximale Actinomycinbildung. Es

werden vielmehr mit denjenigen Stickstoffquellen die höchsten Mycelerträge erzielt, die die kleinste Actinomycinausbeute liefern.

c) Die Bedeutung des p_H -Wertes und der Calcium-Konzentration in der Nährlösung

Bei der Actinomycin-Fermentation wird sehr bald nach dem Einsetzen des Mycelwachstums und Glycerinverbrauchs das Auftreten von Säure in der Nährlösung beobachtet. Bei Anwendung einer physiologisch sauren N-Quelle wie $(NH_4)_2HPO_4$ treten schon nach einer Kulturdauer von 30 Std p_H -Werte von 5 und darunter auf, aber auch bei neutralen N-Quellen wie Asparagin kommt es, wenn auch etwas langsamer, zu einer ähnlich starken p_H -Senkung. Nach Absinken des p_H auf weniger als 6 werden Wachstum, Glycerinverbrauch und Actinomycineinbildung eingestellt. Deshalb haben wir, um die Gärung aufrechtzuerhalten, die Ansätze bei laufender p_H -Kontrolle mit 20%iger steriler Soda-Lösung neutralisiert.

Der Versuch, das optimale, neutrale p_H durch Zugabe von $CaCO_3$ zu erhalten, schlug fehl, weil die abstumpfende Wirkung des Calciumcarbonat bis zu einer Gabe von 5 g/Liter nicht dazu ausreichte. Dabei stellten wir aber fest, daß die Menge des $CaCO_3$ das Verhältnis der X-Komponenten beeinflusst, wie es in Abb. 8 dargestellt ist.

Mit steigender $CaCO_3$ -Dosis findet man eine Zunahme nicht nur des X_0 -Anteils am Gesamtactinomycin, sondern überhaupt der hydrophilen Komponenten X_0 und X_1 gegenüber dem hydrophoben X_2 . Dagegen wird die Ausbeute an Roh-Actinomycin bei Variation der Ca-Gabe in der Schüttelkultur nur wenig verändert.

d) Der Einfluß der Wuchsstoffe

Das Wuchsstoffproblem findet in der Streptomyceten-Literatur wenig Beachtung. Von verschiedenen Autoren sind eine Anzahl rein synthetischer Nährmedien ohne Zusatz von Vitaminen oder komplexen organischen Stoffen beschrieben

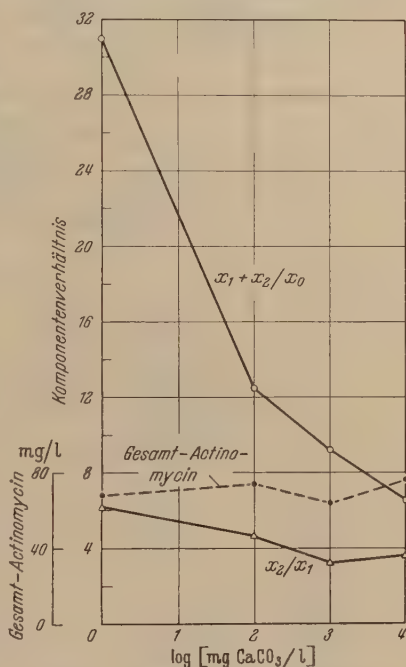


Abb. 8. Verhältnisse der Actinomycine $\frac{X_2}{X_1}$ und $\frac{X_1 + X_2}{X_0}$ in Abhängigkeit vom $CaCO_3$ -Gehalt der Nährlösung. Schüttelkultur mit Glycerin-Asparagin-Nährlösung wie in Tab. 4, Kulturdauer 7 Tage

worden, auf denen Streptomyceten gut wachsen und versporen (v. PLOTTH 1940, PRIDHAM 1948, WAKSMAN 1950, GOTTLIEB 1953).

Die Wirkung von Wuchsstoffgaben auf die Bildung antibiotischer Substanzen durch Streptomyceten ist je nach Art des Antibioticums ganz verschieden. Beim Actinomycin C hat O. v. PLOTTH (1950) die Wirkung komplexer Zusätze und reiner Vitamine untersucht mit dem Ergebnis, daß die Ausbeute des Antibioticums durch Hefekochsaft und mehr noch durch Corn Steep Liquor gesteigert wird. Das Mycel-

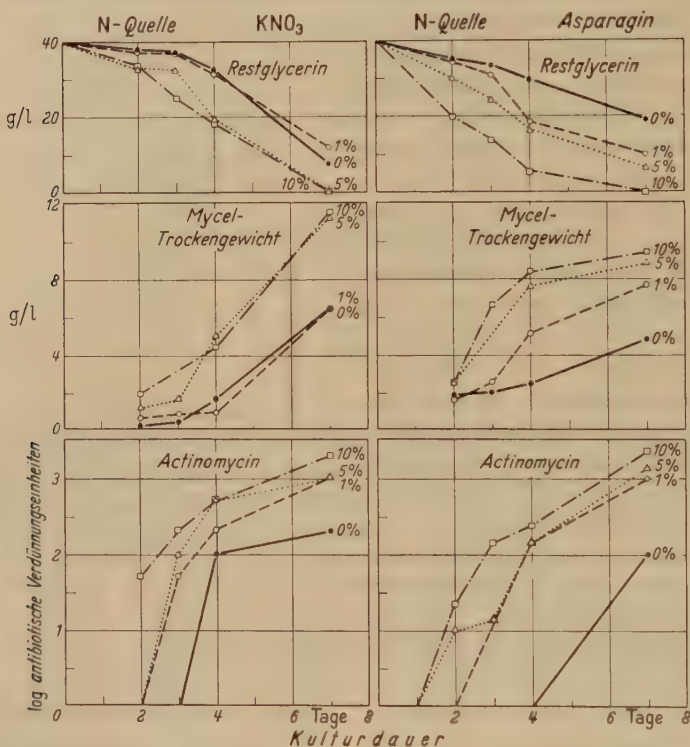


Abb. 9. Actinomycinbildung, Wachstum und Glycerinverbrauch unter dem Einfluß verschiedener Wuchsstoff-Konzentrationen von 0%, 1%, 5% und 10% Hefekochsaft bei 0,4% Asparagin bzw. 0,64% KNO_3 als N-Quelle in modif. CZAPEK-THOM-Nährlösung

wachstum blieb unbeeinflusst. Zusätze verschiedener reiner Vitamine waren ohne Wirkung. Nach PFENNIQ (1953) sind Wuchsstoffe für die Bildung des Actinomycin C nicht notwendig, während die Ausbeute an Actinomycin X durch Zusatz von Hefekochsaft zur Nährlösung erheblich gesteigert wird.

Wir haben die Wirkung eines komplexen Wuchsstoffzusatzes in Form von Hefekochsaft in modif. CZAPEK-THOM-Nährlösung mit Asparagin bzw. KNO_3 als N-Quellen untersucht, siehe Abb. 9 und 10. Wachstum und Actinomycin X-Bildung treten auch in völlig wuchsstofffreier Nährlösung ein, jedoch mit großer, zeitlicher Verzögerung. Bei einem Zusatz

von 5 % Hefekochsaft nimmt in Asparagin-Nährlösung das Myceltrockengewicht um 78,5 % und die Actinomycinausbeute um 60,5 % zu. Bei KNO_3 als Stickstoffquelle betragen die entsprechenden Zunahmen beim Trockenmycel 73,5 % und beim Actinomycin 92 % gegenüber der Kontrolle. Das Verhältnis der Actinomycin-Komponenten wird jedoch durch den Wuchsstoff in einer für uns ungünstigen Richtung beeinflusst, indem der Anteil der hydrophilen Komponenten X_0 und X_1 am Gesamtactinomycin mit steigendem Zusatz von Hefekochsaft abnimmt.

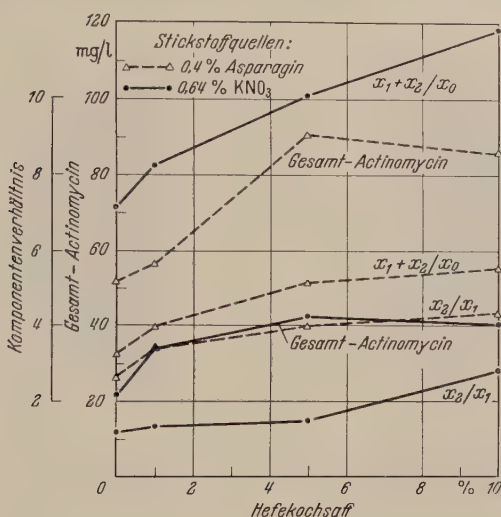


Abb. 10. Die Änderung der Komponentenverhältnisse $\frac{X_1 + X_2}{X_0}$ und $\frac{X_2}{X_1}$ unter dem Einfluß verschiedener Wuchsstoff-Konzentrationen

Wir konnten vorerst noch nicht entscheiden, ob das rasche Einsetzen des Mycelwachstums zu Beginn der Fermentation in der wuchsstofffreien Asparagin-Nährlösung auf der besonders guten Assimilierbarkeit des Kohlenstoffanteils dieser N-Quelle beruht, oder ob hier wie in anderen Fällen, [KOSER (1942)], das Asparagin bzw. die Asparaginsäure selbst Vitaminwirkung zeigt.

e) Der Einfluß von Magnesium- und Phosphatmangel

Die Wirkung mangelhafter Magnesium- und Phosphatnahrung auf die Actinomycinbildung wurde in Schüttelkultur mit modif. CZAPEK-THOM-Nährlösung und 0,4 % Asparagin als N-Quelle untersucht. Es wurde jeweils nur $\frac{1}{10}$ der normalen Magnesium- und Phosphatmengen verabreicht, also 0,01 % K_2HPO_4 bzw. 0,005 % $\text{MgSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$. Die

Abb. 11 und 12 zeigen Papierchromatogramme der aus diesen Ansätzen gewonnenen Actinomycine (vgl. dazu Abb. 2). Bei dem unter Magnesiummangel entstandenen Actinomycin fällt gegenüber der Kontrolle (Abb. 2) vor allem die starke Zunahme von Actinomycin X_1 auf. Das unter Phosphatmangel gebildete Actinomycin enthält ein im Papierchromatogramm einheitliches Actinomycin X_0 , umgeben von einer im sichtbaren Licht wenig auffallenden, schwach grüngelben Zone, die im UV-Licht eine sehr starke, blaue Fluoreszenz zeigt. Bestimmte Kulturbedingungen vorausgesetzt können solche farblosen, stark fluoreszierenden Substanzen



Abb. 11. Actinomycin X aus *Din 452*
bei Magnesiummangel



Abb. 12. Actinomycin X aus *Din 452*
bei Phosphatmangel

Papierchromatogramme im System Butylacetat + Dibutyläther (3 : 1)/10% Na-Kresotinat

zum Hauptprodukt werden. Die chemische Untersuchung dieser Substanzen ist noch nicht abgeschlossen. Unsere Befunde sprechen dafür, daß es sich um Vorstufen (BROCKMANN 1956) oder Abbauprodukte des Actinomycins handelt.

f) Die Bildung von Actinomycin X im belüfteten und gerührten Fermenter

Für die Durchführung einer aeroben Fermentation stellt die Schüttelkultur keine ideale Technik dar, weil aus mehreren Gründen eine optimale Sauerstoffversorgung des Kulturmediums nicht gewährleistet ist (CHAIN 1952). Anders dagegen im belüfteten und gerührten Gärtank, in dem durch ausreichende Luftzufuhr und feinste mechanische Durchmischung von Gas und Flüssigkeit jeder auftretende Sauerstoffbedarf gedeckt werden kann. Ein großer Teil der dabei mitwirkenden Faktoren ist in neuester Zeit untersucht und auch quantitativ behandelt worden (CHAIN 1953, FINN 1954), andere Einflüsse sind immer noch unberechenbar, und müssen von Fall zu Fall empirisch bewältigt werden.

Für unsere Versuche standen zwei verschiedene 15-Liter-Fermenter zur Verfügung, von denen bei sonst gleicher Bauart der eine mit einem 2flügeligen, der andere mit einem 4flügeligen Rührer ausgerüstet war. Dieser Unterschied in der Fermenter-Bauart beeinflusste sowohl die Ausbeute an Roh-Actinomycin als auch das Komponentenverhältnis. Im allgemeinen erhielten wir bei Verwendung der gleichen Nährlösungen, wie sie für die Schüttelkultur als optimal¹ ermittelt worden waren, bei der Submersfermentation in den 15-Liter-Fermentern ähnliche oder etwas höhere Ausbeuten an Actinomycin.

Tabelle 5. *Submersfermentation*

Luftzufuhr: 3 l/min; Rührgeschwindigkeit: 290 Umdrehungen/min

N-Quellen	0,4 % Asparagin			0,4 % (NH ₄) ₂ HPO ₄		
	Rest-Glycerin g/L	Gesamt-Actinomycin mg/L	$\frac{X_1 + X_2}{X_0}$	Rest-Glycerin g/L	Gesamt-Actinomycin mg/L	$\frac{X_1 + X_2}{X_0}$
Fermenter mit 2-flügeligem Rührer						
Abbruch vor Glycerinverbrauch	17	26	3,3	20	47	6,4
Abbruch nach Glycerinverbrauch	0	50	3,7	0	109	12,0
Fermenter mit 4-flügeligem Rührer						
Abbruch vor Glycerinverbrauch	15	39	5,5	10	22	4,4
Abbruch nach Glycerinverbrauch	0	75	10,9	0	45	6,4

Dient Asparagin als Stickstoffquelle, so wird die höchste Ausbeute an Gesamtactinomycin im Fermenter mit 4flügeligem Rührer erzielt, bei Verwendung von (NH₄)₂HPO₄ dagegen im Fermenter mit 2flügeligem Rührer. Damit entfällt die Möglichkeit, die unterschiedlichen Actinomycinerträge auf den bei den zwei Fermentertypen sicher verschiedenen Grad der Sauerstoffsättigung des Kulturmediums zurückzuführen.

Eine einfache Abhängigkeit der Actinomycin-Ausbeute von der Luftzufuhr bzw. der Rührerdrehzahl konnte bei einer Reihe weiterer Versuche ebenfalls nicht gefunden werden. Weiterhin ist Tab. 5 zu entnehmen, daß der Anteil des X₀ am Gesamtactinomycin im Verlauf der Fermentation mit steigendem Glycerinverbrauch abnimmt, und daß er bei gleicher Nährlösung in dem Fermentertyp am niedrigsten ist, der die höchste Ausbeute an Roh-Actinomycin liefert.

¹ Modif. CZAPEK-THOM-Nährlösung mit 4% Glycerin, Asparagin oder (NH₄)₂HPO₄ als N-Quelle, 5% Hefekochsaft und 0,1% CaCO₃.

Verglichen mit der Kultur im Schüttelkolben hatte die CaCO_3 -Dosis in der Nährlösung hier einen viel größeren Einfluß auf die Actinomycinbildung. CaCO_3 -Gaben von mehr als 1 g/l, durch die in Schüttelkultur die günstigsten Ausbeuten und Komponentenverhältnisse erzielt wurden (Abb. 8), wirkten im Fermenter wachstumsverzögernd und ausbeutevermindernd.

Auf das Komponentenverhältnis hat die Menge des zur Nährlösung gegebenen CaCO_3 die gleiche Wirkung wie in der Schüttelkultur: Der Anteil des X_0 am Gesamtactinomycin steigt mit zunehmender CaCO_3 -Gabe.

g) Antibiotische Wirksamkeiten der Actinomycine X_0 , X_1 und X_2

Nach den oben beschriebenen Verfahren stellten wir eine größere Menge Actinomycin X-Gemisch her und isolierten daraus nach den von BROCKMANN u. GRÖNE (1954) beschriebenen Methoden die reinen Actinomycine X_1 , X_2 und $X_{0\beta}$.

Im antibiotischen Verdünnungstest nach SCHMIDT u. MOYER (1944) ermittelten wir die folgenden minimalen Hemmkonzentrationen für *Staphylococcus aureus*.

Actinomycin X_2	$4,55 (\pm 0,25) \cdot 10^{-5} \text{ mg/cm}^3$
Actinomycin X_1	$7,15 (\pm 0,25) \cdot 10^{-5} \text{ mg/cm}^3$
Actinomycin $X_{0\beta}$	$19,4 (\pm 2,0) \cdot 10^{-5} \text{ mg/cm}^3$

Schlußbemerkungen

Die Ergebnisse aller von uns durchgeführten Versuche zeigen deutlich, daß praktisch durch jede Veränderung der mikrobiologischen Kulturbedingungen sowohl die Gesamtausbeute an Actinomycin X als auch das Komponentenverhältnis beeinflußt werden.

Mycelbildung und Actinomycinertrag zeigen einen recht ähnlichen zeitlichen Verlauf. Beide haben ein Maximum zur Zeit des vollständigen Verbrauchs der Kohlenstoffquelle; nach Aufhören des Mycelwachstums erfolgt keine Actinomycinbildung mehr. Unabhängig von der gebotenen Stickstoffquelle ist der jeweils erzielte Mycelertrag der Actinomycin- ausbeute umgekehrt proportional. Diese Befunde sprechen dafür, daß das Actinomycin X kein Abbau- oder Autolysenprodukt des Zell-Eiweißes ist, sondern daß seine Bildung als Seitenreaktion des assimilierenden Stoffwechsels verläuft. Zwar ist die absolute Menge des Actinomycins im Vergleich zum Mycelertrag sehr gering, doch haben wir Grund zu der Annahme, daß die Actinomycin bildenden Streptomyceten neben dem durch seine Farbe und seine antibiotischen Eigenschaften

sehr sinnfällig auftretenden Actinomycin noch eine größere Menge dem Actinomycin nahe verwandter Stoffe bilden. Die Abzweigung der Gesamtmenge dieser actinomycin-ähnlichen Sekundärstoffe aus dem Baustoffwechsel kann durchaus einen Einfluß auf die Wachstumsökonomie der sie erzeugenden Streptomyceten haben, wie wir es bei der Anwendung verschiedener Stickstoffquellen beobachtet haben.

Ein deutlicher Zusammenhang besteht weiterhin zwischen dem Actinomycinertrag und dem Komponentenverhältnis. Stoffwechselhemmende oder -verlangsamende Einflüsse wie mangelhafte Wuchsstoffversorgung oder erhöhte CaCO_3 -Mengen in der Nährlösung verursachen eine geringere Ausbeute an Actinomycin X mit hohem Anteil an X_0 und X_1 bei wenig X_2 ; dagegen führen Wachstumsbedingungen, die eine rasche Fermentation und eine hohe Actinomycinausbeute erlauben, zu einem Actinomycin mit hohem X_2 -Anteil und geringen Mengen X_0 und X_1 . Ähnliches gilt für den zeitlichen Verlauf ein- und derselben Fermentation, wo der Anteil des X_0 mit zunehmendem Glycerinverbrauch und steigender Actinomycinausbeute geringer wird. Wir schließen daraus, daß die Biosynthese des Actinomycin X möglicherweise über leichter wasserlösliche Vorstufen und Komponenten in Richtung zunehmend schwerlöslicher Actinomycine verläuft.

Anhang

Konservierung von Streptomyces-Kulturen in Erde

Eine bei uns häufig auftretende Schwierigkeit, die auch von anderen Autoren (WAKSMAN 1950) oft erwähnt wird, war der allmählich oder auch plötzlich eintretende Verlust der antibiotischen Eigenschaften bei verschiedenen Streptomyceten unserer Sammlung im Verlaufe mehrmaliger Übertragungen der Kulturen auf neue Nährböden. Dabei traten nicht selten gleichzeitig morphologische Veränderungen des betreffenden Stammes ein in Form von mangelhaftem Wachstum, Verlust des Luftmycels oder einer Änderung der Pigmentierung. Die von LINDENBEIN (1952) beschriebene Regenerierung antibiotisch unwirksam gewordener Stämme durch Kultur auf Mangelnährböden leistete auch uns in speziellen Fällen gute Dienste. Wir mußten aber bei mehreren Kulturen beobachten, daß man mit dieser Methode auch das Gegenteil der gewünschten Wirkung, nämlich den vollständigen Verlust der antibiotischen Eigenschaften erhalten kann, wenn die Ernährungsbedingungen im Regenerationsnährboden zu einer Selektion von antibiotisch inaktiven Varianten aus der Streptomyceten-Population führen. Man muß also, um mit der Methode der Mangelnährböden zum Ziel zu kommen, unter Umständen eine große Zahl verschiedener Substrate durchprobieren, in der Hoffnung, auf einen Nährboden zu stoßen, mit

dem man wirklich eine Selektion der antibiotisch wirksamen Stammvarianten erreicht.

Eine direkte Methode zur Wiedergewinnung von Stämmen mit guter antibiotischer Wirksamkeit scheint die Herstellung von Einsporkulturen aus der „degenerierten“ Ausgangskultur zu sein. Dabei liefert das KOCHSche Plattenverfahren mit membranfiltrierten Sporensuspensionen (PFENNIG 1953) ebenso gute Ergebnisse wie die mühsame Einsporisolierung mit dem Mikromanipulator. Sofern die physiologische Degeneration der Ausgangskultur oder das Überhandnehmen antibiotisch unwirksamer Varianten nicht zu weit fortgeschritten ist, werden Neuisolierungen von sehr guter antibiotischer Aktivität erhalten. Die Lagerung der regenerierten Stämme in üblicher Weise auf Agar-Nährböden mit der notwendigen Überimpfung in relativ kurzen Zeitabständen setzt natürlich die Stämme erneut der Gefahr des Verlustes der antibiotischen Eigenschaften aus. Auf der Suche nach einem Verfahren zur stabilen Konservierung sowohl unserer regenerierten als auch der neu isolierten Streptomyceten machten wir die besten Erfahrungen mit der Aufbewahrung in steriler Erde.

Brauner, humushaltiger Lößlehm wurde luftgetrocknet, fein zermahlen und im Verhältnis 1:1 innig vermischt mit gesiebt, 24 Std in fließendem Wasser gewaschenen Sand mit einer Teilchengröße von 0,1—1 mm Durchmesser. Das Gemisch, das nach Messung mit der Glaselektrode ein p_H von 7,2 hatte, wurde in einer Höhe von 10 cm in starkwandige Reagensgläser 150×25 mm eingefüllt, die Gläser mit kurzen, festen Wattestopfen verschlossen und an 3 aufeinander folgenden Tagen je 1 Std bei 3 atü im Autoklaven sterilisiert. Danach waren die Erden steril. Einmaliges, einstündiges Autoklavieren bei 2,5 atü reichte zur Sterilisation aus, wenn man nach BAKERSPIGEL (1953) zur Erde vor dem Sterilisieren 25% ihres Wasserhaltungsvermögens an destilliertem Wasser gab. Die zu konservierenden Streptomyceten wurden in KOLLE-Flaschen auf Glycerin-Glykokoll-Agar kultiviert.

Nach 14tägiger Inkubation bei 30° C wurden Luftmycel und Sporen in sterilem Wasser suspendiert und in die Erdröhrchen gegossen. Diese wurden dann 8 Tage bei 30° C bebrütet und anschließend im Vakuumexsikkator über konz. Schwefelsäure so weit getrocknet, bis das Lehm-Sand-Gemisch locker im Glas umgeschüttelt werden konnte. Die Röhrchen wurden mit Gummikappen luftdicht verschlossen.

Auf diese Weise konnten wir nicht nur gut versportete Stämme über einen Zeitraum von $1\frac{1}{4}$ Jahren unverändert erhalten, sondern auch andere Stämme, denen die Sporenbildung völlig fehlte; so z. B. Stamm *Frank 1097*, einen antibiotisch wirksamen Streptomyceten, der auf keinem der üblichen Nährböden sporuliert und auf Glycerin-Glykokoll-Agar ein üppiges, lichenoides, tomatenrotes und hochglänzendes Substratmycel entwickelt. — Über das Antibioticum aus *Frank 1097* werden demnächst BROCKMANN u. COSTA berichten. — Wir suspendierten das derbe Mycel dieses Streptomyceten in sterilem Wasser und stellten davon

Erdkulturen in der beschriebenen Weise her. Abimpfungen nach 3, 6 und 9 Monaten lieferten antibiotisch gut wirksame Kulturen des Stammes mit dem bekannten Habitus.

Zusammenfassung

Das Antibioticum Actinomycin X wird von einer Gruppe systematisch nicht einheitlicher Streptomyceten gebildet, die sich morphologisch und vor allem physiologisch durch das Vorkommen oder Fehlen eines schwarz-braunen Pigmentes beim Wachstum auf peptonhaltigem Nährboden voneinander unterscheiden. Submerskulturen Actinomycin X-bildender Streptomyceten liefern unter dem Einfluß systematisch variierten Ernährungsbedingungen, wie verschiedener Stickstoffquellen, Kohlenstoff-Stickstoff-Verhältnisse und Wuchsstoffzusätze, sehr verschiedene Ausbeuten an Actinomycin und unterschiedliche Mengenverhältnisse der Actinomycin-Komponenten X_0 , X_1 und X_2 . Zu Beginn der Actinomycinbildung und unter wachstumsverlangsamenden Bedingungen überwiegen die hydrophilen Komponenten X_0 und X_1 . Dagegen wird zum Zeitpunkt maximaler Actinomycinausbeute und unter Kulturbedingungen, die zu einer raschen Fermentation und hohen Actinomycinausbeute führen, ein vorwiegend aus der hydrophoben Komponente X_2 bestehendes Actinomycin vorgefunden. Die zeitlichen Maxima von Mycelertrag und Actinomycinbildung stimmen überein.

Es wird geschlossen, daß die Actinomycinsynthese durch eine Seitenreaktion des assimilierenden Stoffwechsels erfolgt.

Versuche zur Konservierung von Streptomyceten in Erde werden beschrieben.

Herrn Prof. Dr. H. BROCKMANN danken wir für seine großzügige Unterstützung und für sein Interesse an dieser Arbeit.

Literatur

- BAKERSPIGEL, A.: *Mycologia* (N. Y.) **45**, 596 (1953). — BROCKMANN, H., u. H. SCHODDER: *Chem. Ber.* **74**, 73 (1941). — BROCKMANN, H., u. N. GRUBHOFER: *Naturwissenschaften* **36**, 376 (1949). — BROCKMANN, H., u. N. PFENNIG: *Z. physiol. Chem.* **292**, 77 (1953). — BROCKMANN, H., u. K. H. RENNEBERG: *Naturwissenschaften* **40**, 59 (1953). — BROCKMANN, H., u. H. GRÖNE: *Chem. Ber.* **87**, 1036 (1954). — BROCKMANN, H., u. G. PAMPUS: *Angew. Chem.* **67**, 519 (1955). — BROCKMANN, H., G. BOHNSACK, B. FRANCK, H. GRÖNE, H. MUXFELDT u. C. SÜLING: *Angew. Chem.* **68**, 70 (1956). — CHAIN, E. B., et G. GUALANDI: *Congrès internat. biochim. Résumés Commun. Paris* **76** (1952). — CHAIN, E. B., S. PALADINO, D. S. CALLOW, F. UGOLINI and J. VAN DER SLUIS: *Bull. World Health Organization* **6**, 3 (1953). — DIDDENS, H. A., u. L. LODDER: *Die anaskosporogenen Hefen II*, Amsterdam 1942. — DIMAIR, W., H. RIFFARTH u. K. MOLLENKOPF: *Z. analyt. Chem.* **119**,

- 189 (1940). — FINN, R. K.: *Bacter. Rev.* 18, 254 (1954). — GOODALL, R. R., and A. A. LEVY: *Nature (Lond.)* 158, 675 (1946). — GOTTLIEB, D., and M. LEGATOR: *Mycologia (N. Y.)* 45, 507 (1953). — GRUBHOFER, N.: Dissertation der Math.-Nat. Fakultät, Göttingen 1949. — KOSER, S. A., W. H. WRIGHT, and A. DORFMAN: *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* 51, 204 (1942). — KRAINSKY, N.: *Zbl. Bakter. II*, 41, 648 (1914). — LINDENBEIN, W.: *Arch. Mikrobiol.* 17, 361 (1952). — LINGE, H.: Dissertation der Math.-Nat. Fakultät, Göttingen 1951. — PFENNIG, N.: *Arch. Mikrobiol.* 18, 327 (1953). — PLOTTO, v. O.: *Arch. Mikrobiol.* 11, 33 (1940); 14, 192 (1950). — PRIDHAM, T. G., and D. GOTTLIEB: *J. Bacter.* 56, 107 (1948). — SCHMIDT, W. H., and A. J. MOYER: *J. Bacter.* 47, 199 (1944). — WAKSMAN, S. A.: *The Actinomycetes*. Waltham Mass. 1950. — WAKSMAN, S. A., and F. J. GREGORY: *Antibiotics a. Chemother.* 4, 1050 (1954).

Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten, Kliniken usw. ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photos. Vorlagen für Diagramme sind in etwa doppelter Reproduktionsgröße erwünscht.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Selbständige kritische Sammelreferate über einzelne Gebiete sind erwünscht.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse im Umfang von im allgemeinen höchstens 1 Seite anzufügen.

Vorlesungen über Entwicklungsphysiologie

Von Professor Dr. Alfred Kühn, Tübingen. Mit 477 Textabbildungen. IX, 506 Seiten
Gr.-8°. 1955. Ganzleinen DM 43.60

... Die lebendige Darstellung vermeidet jede Schematisierung. Dem Leser wird Tatsachenmaterial in großer Fülle vorgelegt. Die Mannigfaltigkeit der deskriptiven und experimentellen Tatsachen ist gemeistert durch die induktive und systematisierende Herausarbeitung der typischen Vorgänge und der Funktionstypen. Nahezu 500 in einheitlicher Manier hergestellte Abbildungen erläutern den Text und zeigen in eindringlicher Weise, daß Wirkungen in der Entwicklung Gestaltungen sind. Die Liebe und Begeisterung des Autors haben ein faszinierendes Werk entstehen lassen, das jeden an der Biologie Interessierten durch Inhalt und Form, durch Auswahl und Formulierung, durch Herausarbeitung des Gesicherten und der Probleme fesseln muß und manchen verführen wird, sich diesem — wie der Verfasser sagt — charakteristischen Zweig der modernen Biologie zuzuwenden. Professor Autrum — Würzburg, in „Berichte über die gesamte Physiologie“

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Das Leben der Gewächse

Ein Lehrbuch der Botanik. Von Dr. phil. **Friedrich Oehlkers**, o. Professor der Botanik an der Universität Freiburg i. Br. In zwei Bänden.

Erster Band: Die Pflanze als Individuum. Mit 523 Textabbildungen. VIII, 463 Seiten
Gr.-8°. 1956. Ganzleinen DM 39.60

Das vorliegende Buch versucht von der alten, sozusagen klassischen Einteilung der Botanik in Morphologie und Physiologie abzusehen, weil es sich dabei im Grunde genommen um eine Einteilung nach den Arbeitsmethoden handelt. Es gibt Sachgebiete, die gleichzeitig mit beiden Methoden bearbeitet werden müssen, ja, deren Wesen überhaupt darin besteht, daß ein ständiger Wechsel der Methoden erfolgt. So hat das starre Festhalten an der überkommenen Einteilung dazu geführt, daß auch in den neueren Lehrbüchern der Botanik die Genetik keinen Platz hat. Darum scheint es uns angebracht, trotz der großen Zahl der gegenwärtig schon vorhandenen Lehrbücher noch ein weiteres hinzuzufügen, das eine Einteilung nach Sachgebieten vornimmt.

Eine Gruppierung wird insofern versucht, als der 1. Band im wesentlichen die Pflanze als Individuum behandeln wird, der 2. Band hingegen die Pflanze in der Welt. Gewiß ist auch eine solche Einteilung nicht mit aller Strenge durchführbar; denn jede Pflanze ist als Lebewesen ein Individuum und jede Pflanze lebt in der Welt. In dem Augenblick, in dem man die funktionellen Bezüge irgendeiner Erscheinung an einem Gewächs klarstellen will, wird eine Bezugnahme auf die Umwelt unumgänglich sein. Dennoch werden die Pflanzen in ihrer individuellen Struktur in dem 1. Abschnitt des 1. Bandes, der sich mit der Gestalt der Individuen nach Entwicklung und Aufbau befaßt, am ausschließlichen erfaßt werden. Im 2. Abschnitt des 1. Bandes dagegen, der die Grenzen der Gewächse behandelt, wobei der Anfang als Fortpflanzung und Vererbung anzusehen ist, das Ende als Alter, Krankheit und Tod, wird die Blickrichtung auf die Umwelt schon vordringlicher. Im 3. Abschnitt endlich, der die Ursachen der Entwicklung behandelt, werden natürlich auch die Eingriffe der sogenannten äußeren Bedingungen mit erörtert werden müssen.

In dem 2. Band wird sich das nun ständig steigern und gerade das Leben in der Welt wird im wesentlichen Gegenstand der Erörterungen sein. Dieser Band soll mit dem Stoff- und Energieumsatz beginnen. Es sollen sodann die Veränderungen der Pflanzen behandelt werden, die aus unmittelbaren oder phylogenetischen Zusammenhängen mit der Umwelt abzuleiten sind, ein Gebiet, das man als Ökologie bezeichnet. Weiterhin werden die Beziehungen der Pflanzen untereinander erörtert werden, also Soziologie, Symbiose und Parasitismus. Endlich wird ein Pflanzenkatalog gegeben werden müssen, das also, was man landläufig mit Systematik bezeichnet, eine Geschichte der Pflanzenwelt wird sich anschließen, und zuletzt die Grundzüge einer angewandten Botanik, d. h. die Beziehungen zwischen der Pflanze und dem Menschen. Damit wäre alles erschöpft, was zu den Elementen der Botanik gehört. Es ist zu hoffen, daß der 2. Band etwa drei Jahre nach Erscheinen des 1. Bandes beendet sein wird.

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Diesem Heft liegen zwei Prospekte des Springer-Verlages, Berlin-Göttingen-Heidelberg, bei

Verantwortlich für den Anzeigenteil: Günter Holtz, Berlin W 35, Reichpietschufer 20. — Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg. — Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH — Printed in Germany